

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA CIDRAL DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA INTERFACE OSSO-IMPLANTE EM SUPERFÍCIES DE Ti6Al4V E
DO AÇO ISO 5832-9 TRATADAS ELETROQUIMICAMENTE**

CURITIBA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA CIDRAL DA COSTA

**AVALIAÇÃO DA INTERFACE OSSO-IMPLANTE EM SUPERFÍCIES DE Ti6Al4V E
DO AÇO ISO 5832-9 TRATADAS ELETROQUIMICAMENTE**

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia e Ciências dos
Materiais - PIPE, da Universidade Federal
do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Eliana
Bruno Marino

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Anna Raquel
Silveira Gomes

CURITIBA

2012

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida, à minha filha querida e amada Sophia Cidral da Costa Silva, a meus pais Milian Jesus da Costa e Hormínio Cidral da Costa e a toda minha família que sempre me apoiou para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS pela centelha divina do conhecimento dada a minha personalidade em busca do constante aprimoramento;

A professora Dra Claudia E. Bruno Marino pelas orientações, direcionamento científico e toda ajuda durante o mestrado;

A professora Dra Anna Raquel Silveira Gomes pela co-orientação, dedicação aos experimentos *in vivo*, toda ajuda e companheirismo durante o mestrado;

A UFPR, ao PIPE e Usina Piloto pela oportunidade da realização dos experimentos e da concretização deste título;

Aos professores e colegas de trabalho das Usinas Piloto e do Laboratório de Biomateriais e Eletroquímica no Departamento de Engenharia Mecânica/UFPR;

Ao professor Jayme Bordini e ao Médico ortopedista Munif Haftem por toda ajuda nas datas das cirurgias e na aplicação do protocolo da técnica de defeito ósseo em ratos;

Ao LACTEC por toda análise da interface osso-implante e toda a orientação para o entendimento da aplicação da técnica;

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, principalmente a médica veterinária Érica Pedri, em que se dedicou na doação dos materiais anestésicos e na aplicação dos mesmos, bem como, no acompanhamento do pós-operatório dos animais;

Ao profissional Vinicius da Empresa Sandinox, pela doação do material para realização desse estudo;

Aos profissionais envolvidos nas análises DRX, RAMAM e EDS da UFPR;

Aos colegas que conheci nas disciplinas, pela ajuda durante o período da realização das mesmas;

Ao Hospital Regional da Lapa São Sebastião e a todos os meus colegas de trabalho pela compreensão e paciência durante todo o percurso do mestrado;

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho!

RESUMO

A escolha dos biomateriais para implantes ortopédicos é realizada com base nas suas propriedades e também segundo resultados de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Deste modo, o titânio e algumas ligas aparecem com melhor desempenho em substituições ortopédicas por terem excelentes propriedades, tais como: a mecânica e a resistência a corrosão. O aço inoxidável é muito utilizado e aceito em aplicações médicas, por ter em sua composição química, o cromo e o níquel, que melhoram a propriedade mecânica e a sua resistência a processos corrosivos. Neste trabalho avaliou-se a osseointegração na interface osso-implante na liga Ti6Al4V e no aço inoxidável ISO 5832-9, tratados eletroquimicamente, via potenciodinâmica e acrescidos com hidroxiapatita (HA) através de imersão em SBF (*simulated body fluid*), solução que simula os fluídos corpóreos. O crescimento dos óxidos foi realizado sobre a liga Ti6Al4V entre os potenciais de -1,0 V até 5,0 V e para o aço inoxidável ISO 5832-9 de -1,0 V até 1,0 V, em solução de PBS (*phosphate buffered saline*), na velocidade de varredura de 50 mV/s (liga) e 10 mV/s (aço), a temperatura ambiente. Ensaios de voltametria cíclica e de potencial de circuito aberto foram realizados e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para a caracterização qualitativa. Após, caracterização eletroquímica, fios da liga Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 foram submetidos a tratamento superficial eletroquímico e alguns foram imersos por 10 dias em SBF. O ensaio eletroquímico demonstrou que a liga Ti6Al4V tem um comportamento típico dos metais válvula, onde há o crescimento de um óxido de titânio estável do tipo barreira. Já para o aço inoxidável ISO 5832-9, percebe-se que o óxido mantém-se estável na superfície, mas trata-se de uma película mais fina distribuída de forma não uniforme sobre a superfície dos implantes. Já o estudo *in vivo* foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA /UFPR) onde 60 ratos foram divididos em grupos, sendo 2 grupos controle, 2 grupos tratamento anódico e 2 grupos com tratamento anódico + recobrimento de hidroxiapatita. Todos os animais foram submetidos à intervenção cirúrgica para implantação dos fios e logo após o período de 6 semanas estes foram ortotansados e os fios processados para análise por MEV. Assim, o comportamento eletroquímico é concordante com o teste *in vivo* onde as fotomicrografias sugerem a deposição mais uniforme de matriz óssea na superfície dos implantes, principalmente na liga de titânio, quando submetida ao tratamento por anodização ou anodização/HA, onde não houve espaçamento entre o implante e o tecido ósseo. Isso indica que a presença dos óxidos, crescidos potenciodynamicamente, melhora o processo de osseointegração. Em síntese, o contato direto entre osso/implante demonstra a eficiência deste tratamento superficial simples e de fácil controle dos parâmetros eletroquímicos.

Palavras-chave: biomateriais, oxidação potenciodinâmica, recobrimento biomimético e osseointegração *in vivo*.

ABSTRACT

The choice of biomaterials for orthopedic implants is based on their properties and also according to the outcomes from *in vitro* and *in vivo* trials. Thus, titanium and alloys show the best performance in orthopedic replacements for having excellent properties such as mechanical and corrosion resistance. Stainless steel is widely used and accepted in medical applications, for being constituted by the chemical composition, chromium and nickel, which improves the mechanical properties and resistance to corrosive processes. In this study it was evaluated the osseointegration at implant – bone interface in the alloy Ti6Al4V and stainless steel ISO 5832-9, electrochemical treated by potentiodynamic and with hydroxyapatite (HA) by SBF (*simulated body fluid*). The growth of oxides was carried out on the alloy Ti6Al4V between the potential of -1,0 V to 5,0V and the stainless steel ISO 5832-9 between -1,0 V to 1,0 V in PBS (*phosphate buffered saline*), at a scan rate of 50 mV/s (alloy) and 10mV/s (stainless), at room temperature. Assays of cyclic voltammetry and open circuit potential were performed and scanning electron microscopy (SEM) was used for qualitative characterization. After the electrochemical characterization, Ti6Al4V alloy wire and stainless steel ISO 5832-9 were subjected to electrochemical surface treatment and some were immersed in SBF for 10 days. The *in vivo* experiment was conducted with 60 rats divided into 6 groups, two control groups (n=10, each), two anodic treatment groups (n=10, each) and two anodic treatment + hydroxyapatite coating groups (n=10, each). All animals underwent surgery for implantation of the wires in the right tibia. After a period of six weeks the animals were euthanized and the bones were processed for SEM. The electrochemical test demonstrated that the alloy Ti6Al4V had a typical valve's metal's behavior, because it was found stable oxide titanium growing as barrier. It was observed for ISO 5832-9 stainless steel that oxide was maintained stable on the surface, but as a thinner film irregularly distributed on the surface of implants. This behavior was consistent with the *in vivo* test in which the photomicrographs showed uniform bone matrix deposition on the surface of bone implants, particularly in the titanium alloy, when subjected to anodizing or anodizing/HA treatment without space between implant and bone tissue. This indicates that the presence of oxides, potentiodynamic grown, improves the process of osseointegration. In summary, the direct contact between bone/implant demonstrates the efficacy of this simple surface treatment and easy to control the electrochemical parameters.

Keywords: Biomaterials, potentiodynamic oxidation, biomimetic coating and osseointegration *in vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Exemplo de uma curva de tensão e deformação.....	21
FIGURA 2 - Afinidade química dos íons de Ca^{+2} e P^{5+} sobre as superfícies do titânio.....	25
FIGURA 3 - Estrutura do osso: compacto (cortical) e esponjoso	28
FIGURA 4 - Mecanismo de Interação osso / implante	31
FIGURA 5 - Representação da Estrutura Química da Hidroxiapatita	36
FIGURA 6 – Célula eletroquímica. (a) foto geral; (b) detalhes da abertura lateral com <i>o-ring</i>	45
FIGURA 7 - Foto do Eletrodo de Calomelano Saturado (ECS) usado como eletrodo de referência (ER)	46
FIGURA 8 - Foto do Contra Eletrodo de platina (CE)	46
FIGURA 9 - Foto dos corpos de prova da liga Ti6Al4V	47
FIGURA 10 - Foto dos corpos de prova de aço ISO 5832-9	47
FIGURA 11 - Sistema Eletroquímico da marca Microquímica MPQG- modelo 01 ...	48
FIGURA 12 - Voltametria Cíclica: perturbação e resposta	49
FIGURA 13 - Esquema demonstrando as etapas da formação de apatita por meio das modificações na superfície de implantes de titânio imersos em fluido corpóreo.....	52
FIGURA 14 - Embalagens estéreis contendo os mini implantes esterilizados de a) Ti6Al4V e b) Aço Inoxidável ISO 5832-9	55
FIGURA 15 - Isolamento da região antero - lateral média da pata traseira direita por um campo cirúrgico fenestrado	56
FIGURA 16 - Equipamento com motor de baixa rotação utilizado para o defeito ósseo nas tíbias	57
FIGURA 17 - Sistema de broca e contra –ângulo	57
FIGURA 18 - a) Exposição da cortical da região da tíbia do rato; b) Realização do defeito ósseo em região antero- lateral da tíbia direita do rato; c) Região proximal e	

medial da tíbia perfurada, ou seja , com defeito ósseo; d) mini implante da liga Ti6Al4V e do Aço ISO 5832-9; e) sutura da pele	59
FIGURA 19 - Disco cirúrgico flexível diamantado da marca Sorensen	60
FIGURA 20 - Desgaste da cortical óssea para exposição da interface osso/implante.....	60
FIGURA 21 - (a) Foto da tíbia após dessecador/24h, antes do desgaste ósseo; (b) desgaste da tíbia para exposição osso/implante	60
FIGURA 22 - Microscópio eletrônico de varredura da marca Phillips, modelo XL 30.....	62
FIGURA 23 - Voltametrias cíclicas em solução de PBS na velocidade de varredura de 50 mV/s e 10 mV/s. (a) VC da liga Ti6Al4V (b) VC do aço Inoxidável ISO 5832-9.....	64
FIGURA 24 - Diagrama de Pourbaix para o sistema Titânio em meio aquoso	65
FIGURA 25 - Diagrama de Pourbaix para o sistema ferro em meio aquoso a 25°C.....	67
FIGURA 26 - Diagrama de Pourbaix para o sistema Cromo em meio aquoso a 25°C.....	67
FIGURA 27 - Varredura linear de potenciais de -1,0 V a 5,0 V, em solução de PBS na velocidade de varredura de 50 mV/s, para a liga Ti6Al4V	69
FIGURA 28 - Varredura linear de potenciais de -1,0 V a 1,0 V, em solução de PBS na velocidade de varredura de 10 mV/s para o Aço inoxidável ISO 5832-9	70
FIGURA 29 – Tendências de curvas de potencial de circuito aberto para a liga de titânio (Ti6Al4V) recoberta com óxido crescido até 1,0 V e 5,0 V em PBS a temperatura ambiente	71
FIGURA 30 - Fotomicrografias das superfícies (a) liga de titânio Ti6Al4V e (b) aço inoxidável ISO 5832-9, após processo de lixamento (Aumento 3000x)	73
FIGURA 31 – Fotomicrografias das superfícies da liga Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 recobertas com óxido crescido a 5,0 V (a) e 1,0 V (b) (Aumento 3000x)	74
FIGURA 32 - Fotomicrografias das superfícies da liga de titânio Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 recobertas com óxido crescido a 5,0 V (a) e 1,0 V (b), após imersão SBF por 10 dias (Aumento 3000x)	76

FIGURA 33 - Espectro de EDS da Liga Ti6Al4V anodizada a 5,0 V, em solução de PBS.....	77
FIGURA 34 - Espectro de EDS do Aço Inoxidável ISO 5832-9 anodizado a 1,0 V, em solução de PBS	79
FIGURA 35 - Fotomicrografias do grupo controle da liga Ti6Al4V sem tratamento superficial (aumentos de 250x, 500x e 1650x)	82
FIGURA 36 - Fotomicrografias do Grupo controle do aço inoxidável ISO 5832-9 onde sem tratamento superficial (aumentos de 250 x, 500 x e 1650 x)	83
FIGURA 37 - Fotomicrografias do Grupo C (Tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico a 5,0 V sobre o substrato da Liga Ti6AL4V (aumentos de 250x, 500x e 1650x)	86
FIGURA 38 - Fotomicrografias do Grupo D (tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico a 1,0V, sobre o substrato do Aço Inoxidável ISO 5832-9 (aumentos de 250x, 500x e 1650x)	87
FIGURA 39 - Fotomicrografias do Grupo E (Tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico (até 5,0 V), sobre o substrato da liga Ti6AL4V e após imersão em SBF por 10 dias (aumentos de 250x, 500x e 1650x)	91
FIGURA 40 - Fotomicrografias do Grupo F (Tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico (até 1,0 V) sobre o substrato do Aço Inoxidável ISO 5832-9 e após imersão em SBF por 10 dias (aumentos de 250x, 500x e 1650x)	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Módulo de elasticidade do titânio e algumas Ligas, do aço austenítico tipo 316 L e do Osso	22
TABELA 2 - Composição química do aço ISO 5832-9 e do aço 316L em % em massa	26
TABELA 3 - Concentrações iônicas da solução que simula os fluídos corpóreos (SBF) e do plasma sanguíneo humano	51
TABELA 4 - Classificação dos grupos de implantes de acordo com o tratamento superficial utilizado	55
TABELA 5 – Porcentagem atômica dos elementos químicos da Liga Ti6Al4V.....	78
TABELA 6 - Porcentagem atômica dos elementos químicos do Aço Inoxidável ISO 5832-9	79
TABELA 7 - Distanciamento entre os biomateriais e o osso para o grupo controle.	84
TABELA 8 - Distanciamento entre os biomateriais e o osso para os grupos biomaterial/óxido e biomaterial/óxido/HA	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SUS - Sistema Único de Saúde
GPa – Gigapascal
ISO – International Organization for Standardization
Nm – nanômetros
HFM – High Field Model
Å – Ampère
mol.– molaridade
SBF - Simulated Body Fluid
PBS – Phosphate Buffer Solution
µm – Micrometros
V – Volts
Ei – Potencial Inicial
Ef – Potencial Final
Eca – Potencial de Circuito Aberto
°C – Celsius
pH – Potencial Hidrogeniônico
ER- Eletrodo de Referência
CE – Contra-eletrodo
ET – Eletrodo de Trabalho
ELI – Extra Low Interstitial
LSV – Linear Sweep Voltammetry
CV – Cyclic Voltammetry
Eca – Potencial de Circuito Aberto
HA – Hidroxiapatita
mV/s – milivolts por segundo
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
EPI – Equipamento de Proteção Individual
mm – milímetros
Mg – miligrama

Kg – quilograma

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

EDS – Espectroscopia de Energia Dispersiva

XPS – Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X

ECS – Elerodo de Calomelano Saturado

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

1.1. Histórico e Aspectos Gerais dos Biomateriais Metálicos.....	16
--	----

Capítulo 2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Titânio e algumas ligas.....	20
-----------------------------------	----

2.2. Aço Inoxidável ISO 5832-9.....	25
-------------------------------------	----

Capítulo 3 – PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO

3.1. O Tecido Ósseo.....	28
--------------------------	----

3.2. Interface osso-implante.....	29
-----------------------------------	----

3.3. Tratamentos Superficiais em Biomateriais.....	32
--	----

3.3.1 Modificação Química e Física.....	32
---	----

3.3.2 Modificação Eletroquímica.....	34
--------------------------------------	----

3.3.3 Materiais Bioativos e Técnicas de Recobrimento com Hidroxiapatita.....	35
--	----

Capítulo 4 - TESTES *IN VITRO* E *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO

4.1 Estudos <i>In Vitro</i>	39
-----------------------------------	----

4.2 Estudos <i>In Vivo</i>	40
----------------------------------	----

Capítulo 5 - OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral	43
---------------------------	----

5.2. Objetivos Específicos.....	43
---------------------------------	----

Capítulo 6 - MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Estudo Eletroquímico e de Obtenção de Hidroxiapatita	44
---	----

6.1.1. Materiais	44
------------------------	----

a) Célula Eletroquímica	44
b) Eletrodos	45
c) Eletrólitos	47
d) Equipamento	48
6. 2. Métodos	49
a) Crescimento do Óxido por Voltametria Linear de Potencial	49
b) Estabilidade do Óxido por Potencial de circuito Aberto	50
c) Formação de Hidroxiapatita pelo Método Biomimético	50
d) Procedimento Experimental	53
6.3. Estudo Analítico em Ratos	53
6.3.1 Material.....	53
a) Modelo Animal	54
b) Mini-implantes	54
6.3.2. Métodos	56
a) Tratamento Superficial nos Implantes	56
b) Técnica Cirúrgica	56
6.3.3. Análises de Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	61

Capítulo 7 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Comportamento eletroquímico dos Sistemas Ti6Al4V/óxido e Aço Inoxidável/óxido	63
7.2. Crescimento dos Filmes de Óxido na Superfície da liga de titânio Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9	68
7.3. Estudo do processo de dissolução espontânea através do potencial de circuito	

aberto	71
7.4. Caracterização Morfológica das Superfícies dos Corpos de Prova recobertas com óxido	72
7.4.1 Análise por MEV-EDS do Óxido da Liga Ti6Al4V e do Aço Inoxidável ISO 5832-9.....	77
7.4.2. Avaliação osseointegrativa e comparativa entre os biomaterias a base de titânio e de aço inoxidável após intervenção cirúrgica	80
Capítulo 8 – CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO 1	109
APÊNDICE	114

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e Aspectos Gerais dos Biomateriais Metálicos

Nos últimos anos no Brasil, o perfil da morbimortalidade vem se alterando bastante. A incidência de determinadas causas de óbitos sobre diversas faixas etárias têm modificado com as intervenções públicas, tais como, o saneamento básico (IBGE, 2009). As causas evitáveis relacionadas a doenças infecciosas e parasitárias, a má nutrição e os problemas decorrentes à saúde reprodutiva, que historicamente afetava menores de cinco anos, vem cada vez mais perdendo a predominância (DATASUS, 2007).

Por outro lado, são crescentes as causas de mortes relacionadas às enfermidades transmissíveis e causas externas (violentas) (IBGE, 2009). A violência e a migração da área rural para as cidades se transformaram num fenômeno cada vez mais generalizado, incidindo sobre jovens e adultos – jovens prioritariamente do sexo masculino, tendo como conseqüência os acidentes com arma branca, arma de fogo e acidentes automobilísticos, os quais comprometem o sistema músculo-esquelético (IBGE, 2009).

Com base nestes dados, um dos maiores agravantes provenientes de causas externas é o trauma. E este geralmente acontece em alta energia, ou melhor, com grande impacto, podendo ocasionar fraturas. Os tipos de mecanismos de trauma, a alta morbimortalidade e os gastos diretos e indiretos fazem das fraturas um problema de saúde pública (MORAES *et al*, 2009).

Fraturas de ossos longos dos membros inferiores são comuns na traumatologia, sendo que as diafisárias do fêmur apresentam uma incidência anual de 1 a 4: 10.000 habitantes (DATASUS, 2007; SINGER, *et al* , 1998). A maioria delas ocorre durante acidentes de trânsito, quedas de altura ou ferimento por arma de fogo e o mecanismo mais comum de lesão é a carga de flexão, resultando em uma fratura transversa (MORAES *et al*, 2009). Muitas das fraturas colocam em risco a vida do indivíduo, não apenas por causa das complicações imediatas como

sangramento ou traumas associados, mas também por causa das complicações subseqüentes relacionadas ao tratamento da fratura, como infecções, retardo de consolidação, mau alinhamento e recidivas (FERNANDES *et al*, 2002) .

Muitos estudos têm investigado a viabilidade de materiais compatíveis ao corpo humano e que acelerem o processo de recuperação dos tecidos, especialmente no processo de consolidação óssea (MARIOLANI 1993; CAMPOS 2001; GUGELMIN 2009).

Os materiais mais estudados e utilizados para este fim são as ligas metálicas. Elas representam a classe de biomateriais com mais elementos na tabela periódica, ocupando as colunas IV B, V B e VI B e alguns têm como principal característica a formação espontânea de um óxido estável na superfície. Este grupo de metais são os chamados “metais válvula” onde há formação de películas finas de óxidos (da ordem de monocamadas) que dificilmente sofrem redução, são eles: Ti, Nb, Ta, Zr, Hf, Al. Comercialmente, o metal mais utilizado para implantes é o titânio. Contudo, como a maior parte dos casos de fraturas ósseas é custeada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), a utilização do aço inoxidável também se torna uma realidade e isso se deve a seu baixo custo e por apresentar menor capacidade osseointegrativa, em casos de implantes temporários (JAIMES, 2010).

O primeiro registro do uso de implantes metálicos data de 1565 onde foi utilizada uma placa de ouro para reparação de uma fissura de palato. Depois de um século, existem relatos do uso de fios de ouro, ferro e bronze para suturas. Em 1886 foi introduzida uma placa de níquel dentro do osso e em 1895, com a descoberta dos raios-X, pode-se observar melhor a consolidação de fraturas ósseas. Com isso, houve um avanço na utilização das fixações metálicas para estabilizações e fixações de fraturas (GUGELMIN, 2009).

Os implantes metálicos foram utilizados mais efetivamente a partir da década de 30, e alguns fatos foram relevantes para essa ocorrência: a descoberta da penicilina e o surgimento do conceito de cirurgia asséptica, ambos contribuíram para procedimentos cirúrgicos e o uso de biomateriais nos mesmos (SANTOS, 2008). A partir de pesquisas do sueco Branemark, na década de 80, que o conceito de osseointegração foi definido e o uso do metal como implante popularizado (BRANEMARK, 1985). Este conceito foi o mais aceito e divulgado na literatura e se

refere ao contato direto entre o tecido vivo e o material implantado. A partir disso, muitos estudos foram direcionados para analisar e avaliar as propriedades dos metais e como consequência melhorá-las através de tratamentos de superfície a fim de proporcionar melhor biocompatibilidade e menos toxicidade quando em contato com o organismo vivo.

Neste sentido o presente estudo avaliou a interface osso/implante de dois biomateriais muito usados em aplicações na área da saúde, a liga Ti6Al4V e o aço inoxidável ISO 5832-9. Estes biomateriais foram submetidos a tratamento eletroquímico, via potenciodinâmica, e recobrimento biomimético, a fim de se obter melhores os parâmetros de análise e comparação, tais como, os efeitos de tais biomateriais e tratamentos no organismo vivo, no caso, em tíbias de ratos.

A presente dissertação possui 9 capítulos assim estruturados:

Capítulo 1: introdução ao tema mostrando a relevância atual, o histórico e alguns aspectos da utilização dos implantes metálicos em aplicações na área da saúde.

Capítulo 2: apresenta a revisão de literatura sobre os dois biomateriais utilizados nesta pesquisa – a liga Ti6Al4V e o aço inoxidável ISO 5832-9- e que demonstram ser, na atualidade, os metais mais utilizados na área da saúde.

Capítulo 3: este capítulo aborda o processo de osseointegração mostrando que este é um processo contínuo e pode ser ativado com mais efetividade e sem danos ao tecido ósseo quando o implante recebe um tratamento de superfície. Deste modo, apresenta alguns tratamentos de superfície, sendo que estes podem ser utilizados isoladamente ou em conjunto.

Capítulo 4: neste capítulo são abordados os testes *in vitro* e *in vivo* utilizados comumente em pesquisas experimentais. Os testes *in vitro* geralmente são antecessores dos estudos *in vivo* (modelo experimental animal).

Capítulo 5: são apresentados os objetivos do estudo: geral e os específicos.

Capítulo 6: compreende a descrição dos materiais utilizados e na metodologia aplicada para os experimentos eletroquímicos, *in vitro* e *in vivo*.

Capítulo 7: são apresentados os resultados obtidos e a discussão dos mesmos no processo experimental.

Capítulo 8: apresenta as conclusões obtidas neste estudo.

Capítulo 9: recomendação de trabalhos futuros que venham contribuir para o desenvolvimento do tema investigado.

Capítulo 2

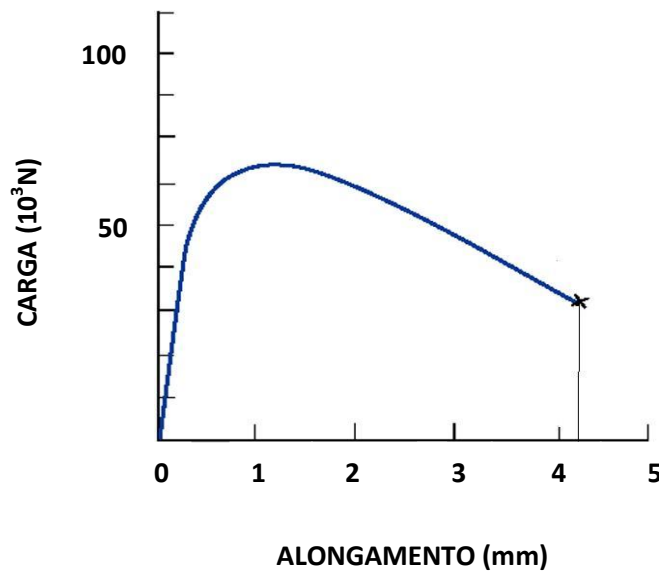
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Titânio e algumas ligas

As ligas de titânio foram originalmente desenvolvidas para a indústria aeroespacial, por causa de sua boa relação resistência/peso, mas com o passar do tempo devido às propriedades físico-químicas deste material, como a resistência à corrosão, ampliou-se à sua área de aplicação na instrumentação cirúrgica e nos implantes cirúrgicos (BOYER, 1979).

O titânio e suas ligas têm sido amplamente utilizados na reposição de tecidos duros, tais como o ósseo e na reposição de válvulas cardiovasculares, uma vez que esse metal possui propriedades importantes como baixo módulo de elasticidade comparado a outros metais (da ordem de 110 GPa), boa resistência à fadiga, resistência à corrosão e excelente biocompatibilidade (HANDBOOK, 2003). As aplicações do titânio e suas ligas na área biomédica incluem desde válvulas e dispositivos artificiais para uso cardiovascular a aplicações mais estruturais como parafusos e pinos para implantes odontológicos e próteses ósseas para membros superiores e inferiores (LIU, 2004).

O titânio comercialmente puro (Ti cp) pode ser classificado em 4 graus distintos, que variam geralmente na concentração de oxigênio, sendo o grau 4 o mais comum e estável (ALBREKTSSON, 1985). Traços de outros elementos tais como nitrogênio, carbono, hidrogênio, ferro, alumínio e vanádio têm sido também detectados e adicionados para a estabilidade ou melhoria das propriedades mecânicas e físico-químicas, como o limite de proporcionalidade, tornando o metal mais resistente à deformação plástica. As deformações plásticas se iniciam no ponto na qual a curva de tensão-deformação, apresentado na Figura 1, deixa de ser linear, sendo este ponto chamado de limite de proporcionalidade (limite elástico) de um material metálico submetido a uma carga ou tensão.



(SILVA *et al*, 2003)

Figura 1: Exemplo de uma curva de tensão e deformação

Com o acréscimo de alumínio e vanádio, como elemento de liga ao titânio, como é o caso da liga Ti6Al4V, existe um aumento no limite de proporcionalidade do metal devido à estabilização da estrutura cristalográfica cúbica de corpo centrado e um pequeno aumento no módulo de elasticidade (JESUÍNO *et al*, 2001). A adição de alumínio estabiliza a fase α (hexagonal compacta), enquanto que a adição de vanádio estabiliza a fase β . A maioria das ligas de titânio é constituída de cristais da fase α ou contém pequenas quantidades da fase β (cúbica de corpo centrado) na matriz α . Assim, a propriedade mais importante derivada dessa combinação é a resistência às cargas cíclicas, as quais um implante ortopédico está sujeito a receber (JESUÍNO *et al*, 2001).

A propriedade mecânica do titânio e de suas ligas, apresentada na Tabela 1, caracteriza-se pela alta razão resistência mecânica/massa específica, diferenciando-se pelo baixo módulo de elasticidade (aproximadamente 100 a 110 GPa) quando comparado a outros metais, como as ligas de cromo – cobalto (248 GPa) e os aços inoxidáveis (200 GPa). Mesmo tendo em média 5 a 6 vezes um módulo de elasticidade maior quando comparado ao osso compacto (Tabela 1), as ligas de titânio são consideradas um dos melhores biomateriais aplicados na ortopedia. Assim, é um biomaterial com uma microestrutura que apresenta uma resistência

mecânica mais elevada e um baixo módulo de elasticidade comparado a outros metais e que por sua vez melhora a distribuição de carga através de todo tecido ósseo circundante (HE & HAGIWARA, 2006). Um baixo módulo de elasticidade é desejável, pois significa que o biomaterial se deforma elasticamente ao receber cargas sem sofrer ruptura. Já os aços inoxidáveis, exemplificado pelo 316L, apresentam um módulo de elasticidade de 200 GPa, ou seja, duas vezes maior que a liga Ti6Al4V, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Módulo de elasticidade do titânio e algumas ligas, do aço austenítico tipo 316 L e do Osso.

Titânio e Algumas Ligas, Aço e Osso	Microestrutura	Módulo de elasticidade (GPa)
Ti cp	α	105
Ti6Al4V	α/β	110
Ti6Al7Nb	α/β	105
Ti12Mo6Zr2Fe	metaestável β	74-85
TiZr	matriz α/β	N/A
Aço Inoxidável 316L	Austenítica	200
Osso	Composição Viscoelástica	10-40

(LIU *et al*, 2004; TSCHIPTSCHI & PINEDO, 2010)

Outra característica relevante deste biomaterial é a resistência à corrosão. A

formação espontânea do óxido na superfície, em contato com o ar atmosférico ou com a água, pode apresentar os seguintes filmes de óxido: TiO , Ti_2O_3 , e/ou TiO_2 . O TiO_2 (dióxido de titânio) é considerado o mais estável e pode ser formado anodicamente segundo a reação:



Este óxido forma uma película contínua e aderente no substrato de titânio de aproximadamente 2 a 10 nm de espessura. A excepcional biocompatibilidade se dá pela interação desta fina camada com os fluídos corpóreos (CHEN, 2005). Tanto a espessura quanto a composição química da camada de óxido de titânio exibem importante papel na adsorção de proteínas, provenientes dos fluídos biológicos bem como na atração de células em sua superfície (YANG, 2010; LIU, 2004).

Assim, a natureza, a composição e a espessura dos óxidos que se formam sobre a superfície dependem das condições do meio. Na maioria dos meios aquosos o óxido que se forma é tipicamente o dióxido de titânio - TiO_2 . Contudo, em alguns casos, o TiO_2 pode ser convertido em 50% ao oxi-hidroxi de titânio, o qual em soluções aquosas será sempre indicado:



Essa reação se deve, provavelmente, à nucleação e ao aumento dos buracos bidimensionais do filme anódico durante a polarização (DYER, 1978).

As teorias desenvolvidas para explicar a ocorrência de filmes de óxidos sobre diferentes substratos metálicos existem há mais de 5 décadas, contudo ainda hoje são estudadas a fim de esclarecer os mecanismos de formação e crescimento destes filmes sob diferentes meios. O crescimento anódico de filmes de óxidos em meios aquosos pode ser explicado pelo modelo de alto campo (*High Field Model* – HFM).

Este modelo é representado pela seguinte expressão:

$$j = A \exp(B\varepsilon) \quad \varepsilon = V/L$$

Onde:

j = densidade de corrente, responsável pela formação do filme

ε = campo elétrico aparente

V = potencial aplicado

L = espessura do filme

A, B = constantes (parâmetros dependentes da temperatura)

Os metais válvula dos grupos IV, V e VI de elementos de transição, tal como é o titânio, permanecem sempre recobertos por uma película de óxido. O filme de óxido de titânio obedece à lei cinética do Modelo de Alto Campo (MARINO, 2001), ou seja, a espessura da película possui um crescimento linear com o aumento do potencial aplicado. Os filmes de óxidos crescidos anodicamente sobre o titânio se comportam como semicondutores e sua taxa de crescimento, segundo Marino (2001) é de aproximadamente de $25,1 \text{ \AA V}^{-1}$. Estes filmes, formados naturalmente sobre o titânio e suas ligas, embora sejam invisíveis a olho nu são muito resistentes à corrosão, pois são termodinamicamente muito estáveis, conforme mostra o diagrama de Pourbaix que será apresentado e discutido no capítulo 7. Desta forma, o titânio permite ligações diretas entre osso/implante, fortalecendo a união entre eles e, conseqüentemente diminuindo o processo inflamatório que ocorre pelo procedimento de implantação do material. O processo inflamatório decorrente do trauma e do processo cirúrgico é a principal causa de perda de implantes ao longo do tempo (HE & HAGIWARA, 2006). Esta bioatividade foi demonstrada *in vitro* através de testes que sugerem a afinidade química do titânio em formar em sua superfície carbonato de hidroxiapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3(\text{OH})$), principal componente presente na fase mineral ou inorgânica do osso (KOKUBO, 1996). (Figura 2)

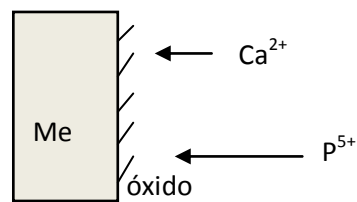


Figura 2: Afinidade química dos íons de Ca^{2+} e P^{5+} sobre as superfícies do titânio.

A figura 2 é um desenho esquemático da afinidade química dos íons cálcio e fósforo sobre a superfície do metal já recoberta com seu óxido. A camada de TiO_2 , obtida rapidamente em contato com o ar ou água, atrai tais espécies favorecendo a osseointegração entre o osso e o implante (CHIANG, 2009).

2.2. Aço Inoxidável ISO 5832-9

Os aços inoxidáveis são metais a base de ferro contendo um mínimo de 10,5% de cromo, quantidade esta, necessária para prevenir o processo de corrosão quando em contato com o ar atmosférico, por isso a designação inoxidável (HANDBOOK, 2003). A maioria dos aços contém 30% de cromo e 50% de ferro, sendo também uma das características deste metal a formação de um óxido em sua superfície de aproximadamente 2 nm de espessura.

O acréscimo de cromo (no mínimo 10,5%) atribui ao metal maior resistência à corrosão, pois este reage rapidamente com o oxigênio. Quando acrescentados níquel e molibdênio, há a melhora das propriedades físico- químicas do material e a prevenção contra a corrosão (HANDBOOK, 2003).

O emprego dos primeiros aços inoxidáveis em implantes ortopédicos iniciou-se em 1926 e a estes se seguiram as ligas de níquel, titânio e tântalo (VILLAMIL, 2002). A sua utilização na área da saúde necessita de uma especificação própria, ou seja, uma norma específica que regulamenta sua composição química para uso em humanos. Isso se deve pelo contato do material com o tecido humano e por este ter condições salinas (presença de cloretos). Estudos recentes sugerem que o aço ISO 5832-9 (ASTM F 1586) apresenta um melhor desempenho em implantes ortopédicos (implantes temporários ou permanentes) quando comparados ao aço

inoxidável 316L (VILLAMIL, 2002; VILLAMIL, 2010).

A melhora do desempenho deste material em aplicações médicas se deve basicamente pela utilização de nitrogênio em sua composição química, onde lhe confere melhores propriedades mecânicas e a presença do elemento cromo, em torno de 20,7%, que lhe atribui alta resistência à corrosão devido à presença de filmes de óxidos de cromo estáveis e protetores. Outros elementos que também contribuem para resistência a corrosão são: o Ni, Mo e o Nb. A Tabela 2 apresenta a composição química do aço.

Tabela 02. Composição química do aço ISO 5832-9 e do aço 316L em % em massa.

	C	Si	Mn	Cr	Ni	Mo	N	P	S	Nb
ISO 5832-9	0,015	0,33	4,09	20,7	9,94	2,5	0,32	0,014	0,005	0,28
316L	0,025	0,012	1,40	16,60	10,40	2,11	0,078	0,039	0,025	---

Norma ISO 5832-1 (ASTM F 138).

(Villamil, *et al* 2002)

Para se entender as estruturas cristalinas dos aços inoxidáveis, há necessidade de se compreender a estrutura cristalina do ferro, seu principal componente. O ferro apresenta duas estruturas cristalinas: o ferro alfa (Fe_{α}) e o ferro gama (Fe_{γ}). O ferro α (estável a temperaturas inferiores a 911°C) apresenta estrutura do tipo cúbica de corpo centrado, já o ferro γ (estável entre 911°C e 1.401°C) é do tipo cúbica de face centrada. As diferentes estruturas cristalinas, em virtude de sua maior ou menor compactação, são responsáveis por diferentes propriedades deste material. Assim, os aços podem ser classificados em: austeníticos (cúbica de face centrada), ferríticos (cúbica de corpo centrado), e martensíticos (tetragonal de corpo centrado) (VILLAMIL, 2002).

Os aços austeníticos são os usados em implantes ortopédicos, estes mantêm suas propriedades em baixas temperaturas, comparáveis as do corpo humano, e sua estrutura cristalina (cúbica de face centrada) garante boas propriedades

mecânicas e de corrosão, favoráveis para as aplicações biomédicas. Não é magnético e, na presença de níquel, estabiliza a sua estrutura cúbica de face centrada (c.f.c.).

Um dos processos mais nocivos à estes materiais é a dissolução/corrosão. A corrosão é um processo que consiste na transformação eletroquímica de um metal do seu estado elementar, não combinado, ao do composto químico – óxido, hidróxido, sal ou apenas íon. De um modo geral, há dois tipos de corrosão: a generalizada e a localizada. Na corrosão generalizada, o metal se dissolve uniformemente e este processo é constante, já na localizada, o metal sofre corrosão em pontos específicos e/ou aleatórios na superfície e quanto mais heterogênea a superfície maior a possibilidade de uma corrosão local.

A corrosão por pite é um dos exemplos de corrosão localizada. O pite se inicia em diferentes pontos da superfície, devido o rompimento do filme passivo, causado por agentes químicos ou por esforços mecânicos. Este rompimento se inicia em pequenas áreas que formam “buracos” e estes evoluem em profundidade. A dimensão da profundidade faz com que o material seja fragilizado e possa assim sofrer deformação em sua estrutura. (SEDRIKS, 1996). Cabe ressaltar que os pites são processos auto - catalíticos e que ocorrem de forma aleatória na superfície.

Quando se tratam de metais e ligas usadas em implantes ortopédicos, a resistência à corrosão associada à resistência mecânica sob fadiga é muito importante. Esta se dá quando o material metálico encontra-se em meios agressivos (neste caso, salinos) combinados com constante esforço cíclico (SUDARSHAN, 1990).

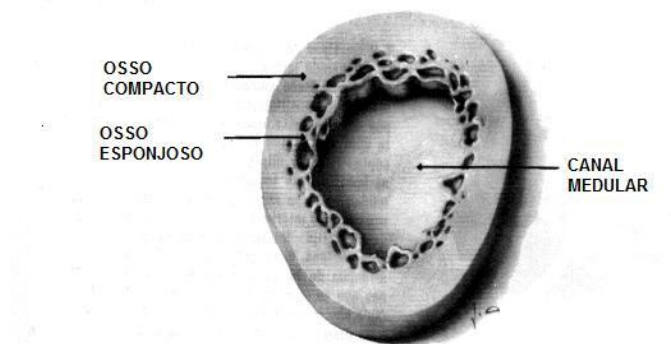
Nestas condições, os aços inoxidáveis, quando comparados ao titânio e suas ligas, não são tão resistentes à corrosão, principalmente quando em meios agressivos como em fluídos corpóreos, contudo seu estudo é extremamente relevante, já que o SUS (Sistema Único de Saúde) ainda o utiliza devido ao seu baixo custo e biocompatibilidade aceitável.

Capítulo 3

3. PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO

3.1. O Tecido Ósseo

O tecido ósseo é continuamente remodelado através de uma seqüência complexa e ordenada de troca de tecido primário pelo secundário, tendo como principal característica, a atividade ininterrupta de três tipos de células: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos (LIEBERMAN & FRIEDLAENDER, 2005). Os osteoblastos são responsáveis pela formação de um novo tecido ósseo, os osteoclastos pela reabsorção deste tecido e os osteócitos liberam fator de crescimento que facilita o recrutamento de células ósseas imaturas para a fase de remodelação, quando se faz necessário maior quantidade de tecido ósseo. As células ósseas são responsáveis pelo resultado estrutural do osso, a camada superficial denomina-se osso cortical denso ou compacto e o osso esponjoso apresenta-se em forma de trabéculas e “espaços” observados na Figura 3.



<http://marcelacortes.vilabol.uol.com.br/imagens/tecido> acesso março de 2012

Figura 3: Estrutura do osso: compacto (cortical) e esponjoso.

Desta forma, o osso compacto é constituído basicamente por uma matriz inorgânica e uma orgânica. Sendo a matriz orgânica composta, aproximadamente de 40% em massa de água, colágeno tipo I e V, glicosaminoglicanos e proteínas adesivas e a inorgânica aproximadamente 60% em massa são compostos de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e cristais de cálcio e fósforo (LIEBERMAN &

FRIEDLAENDER, 2005). Assim, a massa óssea é uma seqüência de trabéculas finas e grossas por vezes compactas, densas e porosas (osso cortical e esponjoso).

A atividade metabólica no osso é constante e pode ser dividida por duas fases distintas. A fase de modelação, que consiste na aposição (sobreposição) ou na reabsorção de células ósseas na superfície do osso e pode alterar seu tamanho ou o seu formato. É um mecanismo fundamental de crescimento, atrofia ou reorientação do tecido ósseo e é a fase que marca o crescimento longitudinal do osso, sendo mais intensa até a idade da adolescência. A fase de remodelação é caracterizada por uma modificação ou reestruturação interna do osso previamente existente, sendo um fenômeno que ocorre nas trabéculas individuais. Permanece por toda a vida e é caracterizada pelo equilíbrio entre as células osteoblásticas e osteoclásticas. (LIEBERMAN & FRIEDLAENDER, 2005)

O tecido ósseo é altamente vascularizado em suas membranas – o periósteo (fina camada conjuntiva que reveste o osso externamente) e o endósteo (camada que reveste a parte interna – medular – e as trabéculas do osso esponjoso) - contribuindo para a nutrição e reparação constante de sua matriz. Participando continuamente da dinâmica de remodelação, ou seja, quanto mais vascularizado o tecido, maior sua atividade celular. Essa característica também é fator importante para a melhor osseointegração.

3.2. Interface osso-implante

A interface entre o osso e o implante é considerada o contato direto entre essas duas estruturas. A resposta do osso ao implante utilizado, tanto na quantidade como na qualidade, está ligada as propriedades da superfície (NOVAES, 2010). Por exemplo, superfícies hidrofílicas interagem melhor com os fluídos corpóreos comparados com as hidrofóbicas e, neste sentido, a composição química de cada superfície vai determinar a interação na adsorção de proteínas e, por conseguinte, na adesão celular (NOVAES, 2010). Assim, o mecanismo de osseointegração é determinado pelas propriedades químicas e físicas do implante e de suas interações com os fluidos corpóreos.

Logo após a implantação, as primeiras reações químicas são reguladas pelos

fluidos teciduais, que promovem a formação imediata de uma camada de macromoléculas glicoprotéicas e de água, que determinarão o substrato da adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas (PUELO & NANJI, 1999).

Mesmo em cirurgias ortopédicas minimamente traumáticas, ocorre uma série de eventos bioquímicos pela interação célula-superfície, iniciando com a mudança do pH da região e desencadeando a liberação de proteínas ósseas morfogenéticas e enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, collagenases e gelatinases, reguladoras do processo de divisão e proliferação celular (AMADEI, 2006). Também surgem os mediadores como: antiinflamatórios, citocinas e fatores de crescimento, essenciais para que células mesenquimais indiferenciadas e células do tecido conjuntivo (fibras colágenas), existentes na medula óssea, diferenciam-se em células osteoblásticas ou fibroblásticas que, por fim, sintetizam proteínas necessárias para a formação de tecidos calcificados e não calcificados, responsáveis pela manutenção do processo de osseointegração.

Com a deposição da matriz colágena não calcificada (fibras de colágeno) e a formação da matriz fibrosa (osso imaturo), agregam-se gradativamente cálcio, fosfato, sódio, magnésio e vários outros componentes minerais do tecido ósseo, de forma sistêmica, entre as fibras colágenas, como parte do processo de maturação do tecido ósseo neoformado (LIEBERMAN & FRIEDLAENDER, 2005). A partir desse processo, a osseointegração é iniciada através da modelação e remodelação de uma camada parcialmente mineralizada, sobre a superfície do implante.

Os principais componentes para a regulação de tecido ósseo adjacente ao implante são os osteoblastos e os osteoclastos com a função de depositar e reabsorver osso para a estruturação da matriz óssea (composta por uma parte orgânica e inorgânica).

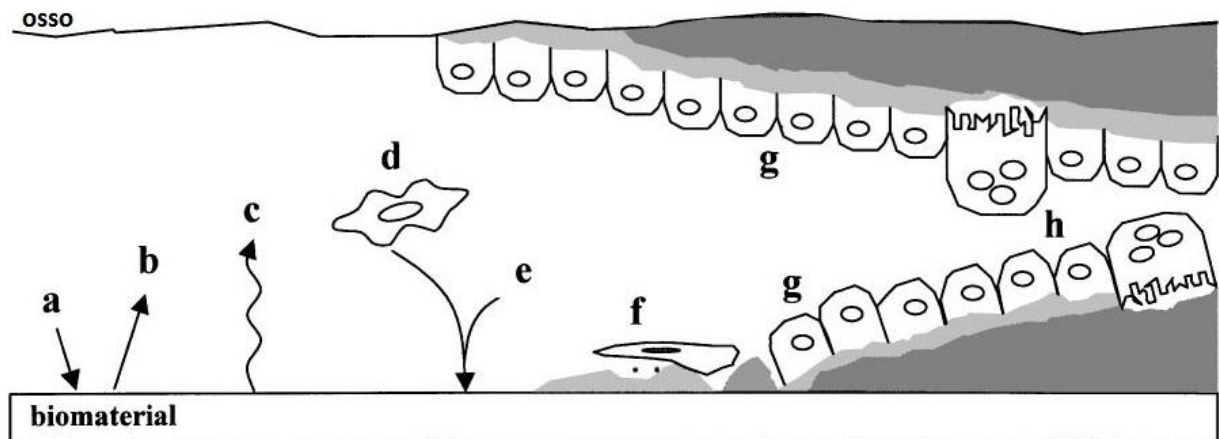


Figura 4 – Mecanismo de Interação osso / implante

a- Adsorção de proteínas ; b -Dessorção de proteínas; c- Mudança na superfície e liberação de material ; d- Células inflamatórias e de tecido conjuntivo aproximando-se do implante; e- Liberação de células osteogênicas ; f - Formação da camada íntima e adesão de células osteogênicas ; g- Deposição óssea (camada de matriz óssea no implante) e h - Remodelação e osso neoformado (PUELO & NANJI, 1999).

A figura 4 mostra o mecanismo de interação osso/implante, destacando as várias etapas desde a adsorção de proteínas até a formação da matriz óssea sobre o biomaterial. Assim, este mecanismo ocorre rapidamente com a adsorção de proteínas e com a formação de uma camada de 2 a 5 nm, no primeiro minuto após o contato com o sangue. As células não se aderem diretamente à superfície do material e sim a camada glicoprotéica extracelular que está adsorvida na superfície do implante. Dentre as várias macromoléculas capazes de promover aderência celular, as mais estudadas são: fibronectina, laminina, epibolina, epinectina, osteopontina, moléculas de colágeno e vitronectina. Logo após a implantação, uma cadeia de reações ocorre e essas células liberam fatores de crescimento ósseo (AMARANTE, 2001).

E é nesse sentido que o titânio e suas ligas demonstram ter eficiência tanto por suas propriedades mecânicas quanto por sua superfície recoberta por um óxido protetor (ALBREKSTSSON, 1987). Segundo Albrektsson (1987) a interface osso – titânio reage de forma hábil logo após a implantação do biomaterial. Exames

histológicos (FRANCO, 2008) demonstraram que a ancoragem do tecido vivo no metal é direta e isso revela excelente biocompatibilidade do material e, por consequência, melhor osseointegração. Para Branemark (1977) a excelente ancoragem entre o osso e o titânio se dá porque este biomaterial minimiza o processo inflamatório agudo após a implantação e, desse modo, melhora as condições de osseointegração.

Para otimizar a osseointegração, vários tratamentos superficiais são estudados e sugerem propiciar a aceleração da adesão de células ósseas ao implante (YUM, 2010). Assim, o desenvolvimento e o uso de técnicas de tratamento superficial baseiam-se em aprimorar ou otimizar o contato osso/implante (CHIANG, 2009).

3.3. Tratamentos Superficiais em Biomateriais

Os tratamentos de superfície são técnicas usadas para melhorar as propriedades de superfície dos materiais. Entre os principais destacam-se: a modificação química, física, a eletroquímica, os materiais bioativos e as técnicas de recobrimento com hidroxiapatita. Muitos estudos comparam os diversos tratamentos superficiais e por vezes os combinam para obter uma melhor resposta do organismo (ANSELME, 2000; YOKOYAMA, 2002; SHALABI, 2006; KOKUBO, 2006).

3.3.1 Modificação Química e Mecânica (Física) na Superfície

Existem vários métodos de modificação química e física, ambos com finalidade de tornar a superfície do implante mais rugosa. A modificação química segue o princípio de se obter rugosidade através de um ataque ácido combinado ou não com tratamento térmico.

O procedimento “*dual acid etching*”, comumente descrito na literatura, consiste na imersão do metal em uma mistura de HCl e H₂SO₄ concentrados por um determinado tempo à uma temperatura de 100°C (CHO & PARK 2003; PARK & DAVIES 2000; TRISI *et al.* 2003; TRISI *et al.* 2002; TRISI *et al.* 2003; COCHRAN *et al.* 2002; KLOKKEVOLD *et al.* 2002). Estes estudos sugerem que existe maior

aposição de células osteogênicas, quando se aumenta a rugosidade na superfície do material, aumentando também o contato osso/implante.

Outro tratamento muito descrito na literatura é o alcalino (*alkali and heat treatment*), que possui o mesmo princípio do ataque ácido, contudo é realizado em uma solução alcalina, 5–10 mol.L⁻¹ de NaOH ou KOH por 24 h. Após seqüência de lavagem e secagem, as amostras são tratadas termicamente por 1 hora a 600°C (KIM *et al*, 1996). Nishigushi e colaboradores (1999) utilizaram os tratamentos alcalino térmico separadamente, bem como, associando-os tendo como parâmetro *in vitro* o teste de imersão em SBF (*simulated body Fluid*) para análise da possível nucleação de hidroxiapatita na superfície. Deste modo, os autores sugeriram que a combinação destes tratamentos produz efeito direto na melhora da osseointegração. Concluíram, também, que o tratamento isolado não era tão eficaz, no caso, somente o alcalino. Observaram que os tratamentos associados produziam superfícies com maior variação de rugosidade e assim possibilitavam maior crescimento de hidroxiapatita nas amostras estudadas.

A modificação mecânica consiste em se alterar a rugosidade superficial através do lixamento, mas em muitos casos o jateamento é o mais usual (AMARANTE, 2001). A técnica de jateamento pode ser feita através de “*sand – blasting*” ou “*grif-blasting*” onde partículas de uma substância sílica, por exemplo, são bombardeadas em ar comprimido e alta velocidade. Essas partículas podem ter vários tamanhos e assim modificar a rugosidade superficial. A energia do impacto das partículas causa deformação plástica, aumentando a rugosidade superficial. Amarante e colaboradores (2001), em um estudo de revisão, indicaram a tendência de superfícies jateadas por partículas pequenas de areia, seguidas de ataque ácido, de oferecerem maior força superficial de cisalhamento (resistência mecânica ao torque). Outro estudo (SUZUKI *et al*, 1997) mostrou a comparação do uso de titânio liso e rugoso; este último obtido pelo jateamento de partículas de titânio (10- 45 µm de diâmetro e 50 µm de espessura) em um substrato de titânio cp (comercialmente puro). As amostras foram implantadas em grupos de animais divididos em titânio liso, titânio rugoso e controle. Os animais foram ortotansados em 6, 16 e 42 semanas após o procedimento cirúrgico. Estes autores observaram que apenas em 6 semanas houve maior contato osso/implante no titânio rugoso quando comparado

ao liso e que a interface apresentou uma matriz de osso compacto paralelo ao implante. Le Guehennec e colaboradores (2008) analisaram 4 métodos de variação da rugosidade sobre superfícies de titânio. Um deles foi obtido pelo jateamento com partículas de alumina (Al_2O_3), tendo como produto final alto teor de alumínio sobre a superfície e pouca adesão celular, através de cultura *in vitro*. Esse estudo demonstrou que partículas de alumina que ficaram “incrustadas” na superfície dos implantes podem alterar a propriedade físico-química do biomaterial e, assim, diminuir a adesão e proliferação de células.

Inúmeros são os estudos que utilizaram a modificação mecânica, no caso mais comum, o jateamento de partículas para comparar e detectar osseointegração em implantes metálicos (YUN, 2010; FERNANDÉZ, 2003; TEIXEIRA, 2004; SUZUKI, 1997, entre outros). A maioria, no entanto, aponta para a dependência da granulometria das partículas ao se produzir diferentes graus de rugosidade, podendo assim variar de 20 μm -40 μm . Contudo já foi observado que espessuras entre 0,2 – 5 μm já são suficientes para a ancoragem óssea ao implante (GRANATO, 2008).

3.3.2 Modificação Eletroquímica

Recentemente, o processo eletroquímico de anodização tem atraído grande atenção devido às modificações de superfície e de propriedades que o mesmo acarreta ao biomaterial (YU, 2010). Nesta técnica, o substrato metálico é imerso em um eletrólito e então aplicado um potencial de baixa voltagem. Dessa forma, se obtém películas de óxidos com características e propriedades controladas por parâmetros eletroquímicos, como potencial (E), corrente (i), velocidade de varredura (v), entre outros. Com este tipo de modificação superficial, obtém-se óxidos estáveis que promovem melhor resistência à corrosão e um aumento da bioatividade do material (CHIANG, 2009). Superfícies anodizadas de titânio têm mostrado melhor resposta do tecido ósseo quando comparadas as usinadas (NOVAES, 2010). Yun e pesquisadores (2010) estudaram implantes tratados eletroquimicamente em uma solução de H_3PO_4 aplicando um potencial de 20 V e em superfícies jateadas com partículas de alumina. Observaram que nos implantes que associaram a anodização e logo após o jateamento houve maior contato osso/implante. Contudo,

estatisticamente não houve diferença significativa, já que para as amostras anodizadas e jateadas o aumento de aposição óssea foi em torno de 61% comparados a 54,8% dos implantes somente anodizados. Por fim, concluíram que nanoestruturas obtidas via eletroquímica, são promissoras por serem de fácil controle do processo (potencial, corrente, concentração do eletrólito e tempo).

Estudos como os desenvolvidos por Burgos e colaboradores (2008) e Huang e colaboradores (2005) indicaram que os implantes anodizados foram melhores osseocondutores e assim responderam melhor ao processo de osseointegração. Neste sentido, o TiO_2 como já foi descrito, tem sido muito utilizado para este fim: acelerar o processo de osseointegração (CRAWFORD *et al*, 2006).

Alguns métodos eletroquímicos podem ser utilizados para se obter películas de óxidos sobre a superfície dos biomateriais como o galvanostático, o potenciostático e o potenciodinâmico. De um modo geral, o emprego de tais métodos como o galvanostático (corrente constante) e o potenciostático (potencial constante) que utilizam altos potenciais para o crescimento dos óxidos na superfície são menos favoráveis para o controle dos parâmetros (potencial, corrente, tempo) de crescimento dos óxidos (TOSSATO, 2009). Já o método potenciodinâmico, utilizado neste estudo, consiste na aplicação de uma varredura linear de potenciais, entre o potencial inicial (E_i) e o potencial final (E_f), na região anódica, mantendo-se então, o sistema polarizado em E_f . Com a aplicação da varredura de potenciais, analisa-se a variação da corrente em função do tempo, cabendo ressaltar que entre o E_i e o E_f são utilizados potenciais de baixa voltagem (na ordem de -1,0 V a 5,0 V).

3.3.3 Materiais Bioativos e Técnicas de Recobrimento com Hidroxiapatita

Os materiais bioativos classificam-se em: biovidros, vitrocerâmicas bioativas e as cerâmicas de fosfato de cálcio, dentre as quais a hidroxiapatita é a mais pesquisada. A hidroxiapatita é o principal componente da matriz óssea (95%), como consequência dessa estrutura bioativa, as suas propriedades como biocompatibilidade e atividade biológica são fundamentais (PATTANAYAK *et al*, 2011; VERCIK *et al*, 2003). A desvantagem desses materiais consiste na baixa resistência à fadiga e à tração, limitando seu uso como implante. No que se refere à

implantes ortopédicos ainda não se desenvolveu um material cerâmico que se iguale as propriedades mecânicas das ligas metálicas (MARQUES, 2007).

A principal atribuição das biocerâmicas é a sua alta compatibilidade com o meio fisiológico (elementos como cálcio, potássio, magnésio, sódio, entre outros) nos quais seus íons se equiparam. Dentre as biocerâmicas, a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e o β -fosfato tricálcico ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) são os materiais comumente usados, por serem compatíveis com a fase mineral do osso e por responderem melhor a aposição de osso no implante (ROSA, 1998). A estrutura química da hidroxiapatita esta representada na Figura 5.

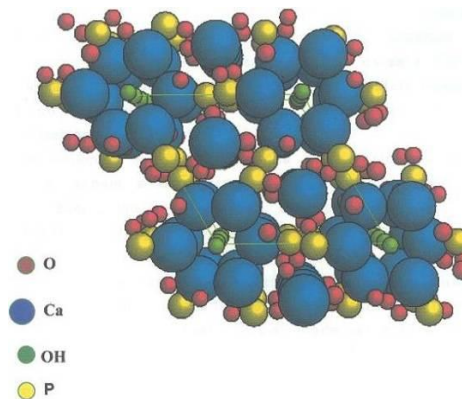


Figura 5: Representação da Estrutura Química da Hidroxiapatita (KAY *et al*, 1964).

Em consequência da similaridade química da hidroxiapatita com o tecido ósseo, muitos estudos apontam para a bioatividade deste material quando usado em conjunto com algum implante metálico (VERCIK *et al*, 2003). A essa afinidade química entre o material bioativo e as células ósseas dá-se o nome de osseocondutividade, ou seja, os glóbulos de hidroxiapatita aceleram a produção de osteoblastos e por seguinte a osseointegração (KOKUBO, 1998; ZHAO XUHUI *et al*, 2009). Também cabe salientar a razão Ca/P da hidroxiapatita (~1,67), que se aproxima da razão destes elementos no osso. Fosfatos de cálcio com razões variando entre 0,5 a 2,0 podem ser sintetizados, sob condições alcalinas ou ácidas. Fosfatos de cálcio com razão maior (~ 2,0) são precipitados em soluções alcalinas e os menores (~0,5) são solubilizados em meios mais ácidos. A hidroxiapatita com razão, aproximada de 1,67, é solubilizada em meio neutro ou alcalino (TOSSATO,

2009).

Para o uso em biomateriais, tais como os metais válvula (Ti, Nb, Ta, Zr, Hf, Al, W), a hidroxiapatita é considerada osseocondutora, atuando como matriz física e permitindo deposição óssea e formação de novo osso sobre o implante (ROSA, 1998; GUOCHAO QI *et al*, 2008).

O método mais utilizado comercialmente de recobrimento com hidroxiapatita é o *plasma spray*. Este método baseia-se na técnica de aspersão térmica onde o emprego de altas temperaturas (em torno de 3000°C) provoca uma variação de espessura, de difícil controle e não obtendo assim, uma superfície uniformemente espessa. Essa diferença de morfologia entre o plasma ejetado e o substrato pode ocasionar falha clínica (NOVAES, 2010). Para minimizar esse efeito e assegurar a propriedade osseocondutiva deste material, opta-se por alternativas como deposição do tipo sol-gel ou a imersão biomimética (AVÉS *et al*, 2008). Dentre estes, destaca-se o método biomimético, sendo uma das técnicas mais promissoras para a produção de fosfato de cálcio, pois simula o processo de mineralização do osso. Este método surgiu a partir de 1980, onde Hench e pesquisadores (1980) observaram que uma camada de SiO₂ ricos em cálcio sobre um substrato estabelecia uma forte ligação entre o osso vivo. Também expuseram a simulação por meio de uma solução com tris-hidroximetilaminometano e ácido clorídrico mantendo um pH de 7,4. Posteriormente, Kokubo e colaboradores (1990) reproduziram a formação da biocerâmica por meio de uma solução chamada SBF (*simulated body fluid*) com concentrações iônicas similares ao do plasma humano. Assim, esta solução simula os fluídos corpóreos, à temperatura e pH fisiológicos.

O processo de formação de precipitados sólidos a partir do SBF possui três etapas: interação química da superfície do implante com a solução, lenta transformação dos núcleos em apatita cristalina e por fim o crescimento do cristal de apatita (ATTAIA, 1988).

Kokubo (1996) propôs um método de processamento biomimético para implantes de titânio, através das seguintes etapas:

- a) Pré-tratamento químico e térmico: a superfície metálica é recoberta espontaneamente por uma camada de óxido de titânio tornando-se

quimicamente estável. Os implantes são imersos em uma solução alcalina e há dissolução da camada do óxido por meio da reação:



Assim, quando o titânio e suas ligas são imersos e reagem com solução aquosa durante o pré-tratamento, ocorre a incorporação dos íons de sódio aos íons HTiO_3 formando um gel mecânica e quimicamente instável, chamado de titanato de sódio (Na_2TiO_3). Para a estabilização deste gel, o titânio é submetido a um tratamento térmico (600°C), ocorrendo a desidratação do titanato de sódio.

- b) Formação de fosfato de cálcio: os implantes são imersos em SBF a 37°C , para a formação densa e uniforme de apatita na superfície do titânio. Primeiramente os íons de sódio da camada de titanato são substituídos por íons H_3O^+ formando grupos de Ti-OH na superfície do metal que está carregada negativamente atraindo os íons de Ca^{+2} do fluído. O acúmulo de íons positivos de cálcio atrai os íons de fosfato (PO_4^{2-}) negativos, para a formação de fosfato de cálcio.

Vercik e colaboradores (2003) utilizaram o método biomimético juntamente com tratamento térmico, para observar a nucleação de apatita em substratos de titânio cp. Isso para que se pudesse obter uma camada mais homogênea de apatita e com morfologia globular sobre a superfície dos implantes. Concluíram então, que este tipo de tratamento é eficaz quando se quer obter uma fase de hidroxiapatita semelhante a do osso, mesmo quando submetidos a tratamentos térmicos entre 400 e 600°C .

Xin e colaboradores (2009) analisaram o crescimento de hidroxiapatita a partir da imersão em SBF ($\pm 37^\circ\text{C}$) em diferentes períodos de tempo 1, 4, 7 e 14 dias, em um substrato de aço 316/L lixado e observaram que os glóbulos de hidroxiapatita cresciam proporcionalmente ao maior tempo de imersão em SBF. Também sugeriram que este crescimento estava diretamente ligado a afinidade química do material com a hidroxiapatita.

Capítulo 4

TESTES *IN VITRO* E *IN VIVO* PARA AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO

4.1 Estudos *In Vitro*

Os estudos *in vitro* têm como principal objetivo a análise da bioatividade dos materiais, que serão inseridos no organismo humano. Estes simulam os processos biológicos a fim de se obter parâmetros e evidências sobre a resposta do hospedeiro.

Alguns estudos (FROSH *et al*, 2003; ZHAO *et al* , 2005) utilizam-se de modelos celulares, como a cultura de células, para obter resposta celular, por exemplo, as osteoblásticas em diferentes superfícies a serem implantadas. Vários estudos indicam que a bioquímica e a topografia dos biomateriais são essenciais para a melhor resposta do meio biológico ao implante (ALBREKTSSON & JACOBSSON, 1987). Deste modo, as propriedades da superfície do biomaterial são fundamentais para a interação das células com o implante (NOVAES, 2010).

Zhao e colaboradores (2005) utilizaram células MG63 (célula similar a osteogênica) em superfícies de titânio com tratamento ácido e jateadas em comparação com superfícies lisas. Observaram que o crescimento celular em superfícies tratadas foi maior que em superfícies lisas. As células cultivadas simularam o crescimento de osso neoformado e a adesão dessas células ao implante quantificou sua resposta ao biomaterial.

A aplicação de materiais bioativos, também contribui para acelerar o processo de adesão celular. O recobrimento com elementos como o cálcio (Ca) e o fósforo (P) em biomateriais tem demonstrado melhor formação óssea devido a similaridade com o osso. Assim também, revestimentos biomiméticos são utilizados para induzir a osseocondutividade e o crescimento mais uniforme de células ósseas por todo o implante. Kokubo e colaboradores (2006) utilizaram o teste de imersão em solução que simula o plasma sanguíneo como parâmetro de deposição óssea no implante. O implante foi imerso em uma solução de SBF e então houve precipitação de

moléculas a base de cálcio e fósforo na superfície do material, em uma razão atômica, semelhante ao do osso, sugerindo que o material e o tratamento empregados, podem ser favoráveis ao crescimento ósseo.

Zanin e pesquisadores (2007) analisaram o crescimento de hidroxiapatita em dois aços inoxidáveis aonde foram submetidos ao tratamento alcalino térmico em uma solução de silicato de sódio. Este estudo sugeriu que a formação e o crescimento de glóbulos de apatita sobre a superfície foram proporcionados pelo tratamento alcalino e pela solução de silicato de sódio, principalmente pelo silicato.

Gugelmin (2009) estudou a bioatividade de superfícies de titânio grau 2 e da liga Ti6Al4V, recobertas com óxido de titânio obtidas via eletroquímica. Os corpos de prova foram imersos em SBF por um período de 10 e 30 dias, com o objetivo de avaliar, *in vitro*, o processo de osseointegração. Foi observada a formação de glóbulos de hidroxiapatita sobre os implantes de titânio, tanto Ti grau 2 quanto da liga Ti6Al4V, em apenas 10 dias de imersão, sugerindo que a camada de óxido de titânio, obtida potenciodinamicamente, sob baixos potenciais (em torno de 5,0 V, favorecia a osseointegração.

Finalmente, superfícies contendo materiais bioativos têm como principal característica acelerar mediadores celulares e promover a diferenciação e a proliferação de células ósseas sobre o implante (VASUDEV, 2004)

4.2 Estudos *In Vivo*

Em geral, estudos de cultura celular, testes de imersão e outros testes *in vitro* podem avaliar a morfologia, a adesão, a proliferação e a diferenciação celular na superfície dos implantes, contudo os seus resultados não refletem a complexidade do meio biológico.

Modelos animais são usados para determinar os eventos biológicos e para isso são utilizadas análises, tais como: microscopia de luz e eletrônica, estudo químico e ensaios biomecânicos. Independente do modelo animal e da técnica cirúrgica, o que se define são informações importantes sobre as respostas fisiológicas de um organismo vivo. Estes modelos são fundamentais e devem anteceder os estudos em humanos, pois se aproximam da fisiologia e da estrutura

do corpo humano (PRADO *et al*, 2006).

Para estudos com implantes metálicos, o recomendado é o uso de animais de pequeno porte - coelhos, porcos, ratos e camundongos. Estes animais são usados para prever o comportamento clínico do biomaterial (RATNER, 2004), como também, por requererem pouco espaço físico, pouco biomaterial para teste, reagirem mais rápido, diminuindo assim o tempo de experimento e serem muito resistentes aos procedimentos cirúrgicos (CARVALHO, 2010).

Franco e colaboradores (2008) utilizaram dois cães adultos jovens, para implantar 3 cilindros de titânio bilateralmente em cada úmero, pela técnica cirúrgica denominada fresagem. Os cilindros metálicos receberam tratamento de superfície com enriquecimento de Ca e P, através da técnica de anodização em meio alcalino. Oito semanas após implantação, os segmentos ósseos foram retirados e analisados através de lâminas histológicas e por histomorfometria. A formação óssea foi observada e os implantes tratados eletroquimicamente em meio alcalino tiveram média de 2,3% maior contato osso/implante comparados aos do grupo controle.

Frosch e colaboradores (2003) utilizaram 17 coelhos para análise *in vivo*. Após cultura de células *in vitro*, estas foram semeadas ao redor do implante de titânio e inseridas, através da técnica de defeito ósseo (fresagem), na parte distal do fêmur. Foram analisados dois grupos: controle (sem recobrimento de células osteoblásticas) e com células ao redor do implante. Estes foram também divididos em períodos para análise: 5, 11 e 42 dias após a implantação. Observaram através de lâminas histológicas e microscopia confocal que após 11 dias de implantação, as amostras que continham células obtiveram aproximadamente 300% mais tecido ósseo no contato com o implante de titânio do que as que não haviam células.

No estudo de Yun e colaboradores (2010) foram utilizados 12 ratos da linhagem *Wistar* e implantes de titânio com 2 mm de diâmetro, estes inseridos pela técnica cirúrgica de fresagem, onde todos os implantes foram inseridos na tíbia direita. Estes foram divididos em dois grupos: anodização e anodização mais jateamento. Após 21 dias de implantação, as tíbias foram retiradas e analisadas através de lâminas histológicas e microscopia de luz. Então, observaram que o contato direto osso/implante que obteve mais eficácia foram às superfícies rugosas, ou seja, os implantes que foram anodizados e jateados com alumina. Este estudo

não avaliou as partículas de alumina “embutidas” nos implantes de titânio, somente sugeriu que a rugosidade favorece a ação osteoblástica.

Em síntese, os testes *in vivo* são extremamente importantes e úteis para os parâmetros clínicos que serão usados futuramente. A utilização de animais de pequeno porte parece ser o mais indicado, o local da implantação (osso escolhido) depende do objetivo de cada estudo e a técnica cirúrgica é determinante para análise da osseointegração. Vários estudos (ENGH *et al*, 1992; PILLIAR *et al*, 1986; JASTY *et al*, 1997) indicaram que se houver micromovimentos entre o osso e o implante, pode haver interferência e crescimento de tecido fibroso ao redor do implante e, deste modo, haverá falha na interface. Assim, a fresagem, que é uma técnica cirúrgica que utiliza defeito ósseo para a introdução do implante, de modo que este não tenha “folga” entre osso/implante, parece ser a mais utilizada em estudos de osseointegração (PRADO *et al* 2006).

Capítulo 5

OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Analisar e avaliar o grau de osseointegração na interface osso-implante em superfícies de Ti6Al4V e do aço Inoxidável ISO 5832-9, tratadas eletroquimicamente e implantadas através de defeito ósseo em tíbias de ratos.

5.2. Objetivos Específicos

- Obter, via eletroquímica, filmes anódicos sobre a liga Ti6Al4V e o Aço Inoxidável ISO 5832-9;
- Caracterizar eletroquimicamente as superfícies anodizadas;
- Recobrir, com hidroxiapatita, pelo método Biomimético, superfícies de Ti6Al4V e aço inoxidável ISO 5832-9;
- Analisar a morfologia e os elementos das superfícies recobertas com óxido e com óxido/hidroxiapatita, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV-EDS);
- Avaliar, através de MEV, e comparar as interfaces osso/implante dos testes *in vivo* em ratos.

Capítulo 6

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os procedimentos e condições experimentais, tais como, material, equipamentos utilizados, procedimentos e metodologia utilizada para o desenvolvimento desta pesquisa.

6.1. Estudo Eletroquímico e de Obtenção de Hidroxiapatita

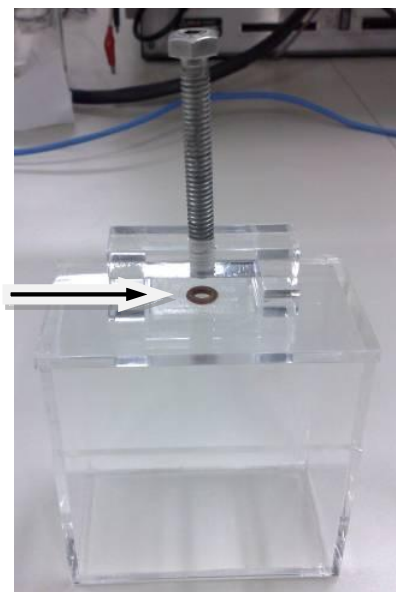
6.1.1. Materiais

a) Célula Eletroquímica

Os experimentos de formação eletroquímica dos óxidos superficiais foram realizados utilizando uma célula eletroquímica personalizada e construída em laboratório (Figura 6). Essa célula foi feita em acrílico de forma retangular com dimensões de 10 cm X 10 cm X 2 cm (C X L X A) e volume útil de 250 ml de solução. Com uma tampa de acrílico contendo dois orifícios destinados ao eletrodo de referência (ER) e o contra-eletrodo (CE). Além disso, possui uma abertura circular lateral, com um *o-ring* de borracha para vedação, com uma área de exposição aproximada de 0,28 cm², do eletrodo de trabalho (ET).



(a)



(b)

Figura 6: Célula eletroquímica. (a) foto geral; (b) detalhes da abertura lateral com *o-ring* (GUGELMIN, 2009)

b) Eletrodos

O eletrodo de referência utilizado foi o eletrodo de calomelano saturado (ECS), $\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{Cl}_2$, KCl_{sat} (Figura 7). Esse eletrodo constituiu-se de um tubo de vidro de 4 mm de diâmetro interno, onde em uma extremidade era colocado mercúrio, em contato com um fio de platina já soldado no vidro; sobre o mercúrio era colocada uma pasta de Hg_2Cl_2 , preenchendo-se a extremidade do tubo com papel de filtro enrolado, posteriormente embebido em solução saturada de KCl. A conexão externa foi feita soldando-se um fio de cobre ao fio de platina, pela outra extremidade do tubo. Este foi finalmente encaixado com junta esmerilhada 14/20 em outro tubo, de diâmetro 8 mm, com uma das extremidades acabada por uma placa de vidro porosa, o qual continha a solução de KCl saturado. O ECS tem um valor nominal de potencial de 0, 242 V com relação ao eletrodo normal de hidrogênio (BARD & FAULKNER, 2001); todos os valores de potencial citados neste estudo tem como referência o ECS.



Figura 7: Foto do Eletrodo de Calomelano Saturado (ECS) usado como eletrodo de referência (ER) (GUGELMIN, 2009)

O contra eletrodo ou eletrodo auxiliar consistiu-se de um fio de platina coberto por um tubo de vidro de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro externo, possuindo contato elétrico em uma das extremidades (Figura 8).



Figura 8: Foto do Contra Eletrodo de platina (CE) (GUGELMIN, 2009)

Os eletrodos de trabalho dividem-se em dois tipos de materiais: a liga de Ti6Al4V ELI (*“Extra Low Interstitial”*) e o aço inoxidável ISO 5832-9 ou ASTM F 138, ambos empregados especialmente em implantes ortopédicos.

O primeiro material foi construído através de uma barra cilíndrica de Ti-6Al-4 V ELI, com a seguinte composição química, regida pela norma ASTM F-136: C 0,010%, N 0,002%, H 0,004%, Fe 0,180%, O₂ 0,102%, Al 5,960%, V 4,000%, e o balanço restante de Ti. A barra de 19,05 mm de diâmetro, procedente da empresa Realum Ind. e Com. de Metais Puros e Ligas Ltda. foi cortada em discos de 4 mm de espessura. Uma foto dos discos originais recém usinados pode ser vista na Figura 9.

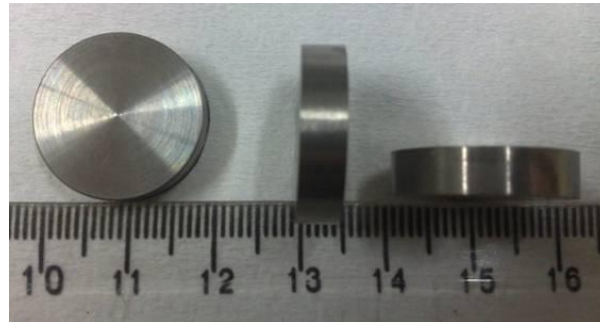


Figura 9: Foto dos corpos de prova da liga Ti6Al4V

O segundo eletrodo de trabalho foi construído a partir de uma barra de aço inoxidável, com a seguinte composição química (% em massa) C 0,015%, Si 0,33%, Mn 4,09%, Cr 20,7%, Ni 9,94%, Mo 2,5%, N 0,32%, P 0,014%, S 0,005%, Nb 0,285, regida pela norma ASTM F-138 - ISO 5832-9. A barra de 10 cm de comprimento por 4 cm de largura, procedente da empresa Sandinox – Biomateriais Ltda. foi cortada em corpos de prova de 2,0 X 1,5 cm (L X A) com espessura de 3 mm. Uma foto dos corpos de prova pode ser vista na Figura 10.

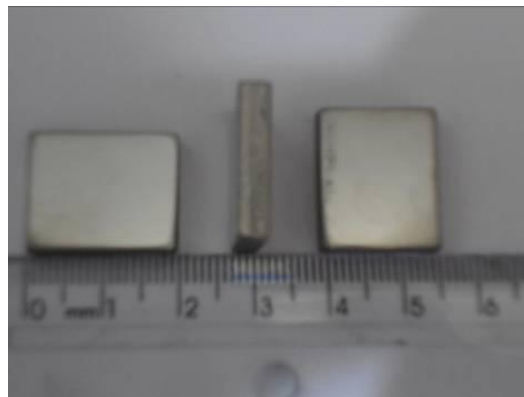


Figura 10: Foto dos corpos de prova de aço ISO 5832-9

Ambos os corpos de prova foram lixados até 1200 de granulometria e logo após foram lavados em acetona, álcool, água destilada e secos em estufa a 36 °C.

c) Eletrólitos

A fim de simular um meio fisiológico para a obtenção dos óxidos anódicos de titânio e aço inoxidável ISO 5832-9, a solução PBS (*phosphate buffered saline*: NaCl

8,77 g L⁻¹; Na₂HPO₄ 3,58 g L⁻¹; KH₂PO₄ 1,36 g L⁻¹; pH 6,9) foi escolhida, por ser uma solução fisiológica com concentração de cloreto de ~ 0,9% (em massa) , além de ser um meio muito utilizado em estudos eletroquímicos.

Para a obtenção de hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) foi utilizada a solução de SBF (*Simulated Body Fluid*: NaCl 8,035 g L⁻¹, NaHCO₃ 0,355 g L⁻¹, KCl 0,225 g L⁻¹, K₂HPO₄·3H₂O 0,231 g L⁻¹, MgCl₂·6H₂O 0,311 g L⁻¹, HCl 1M 39 mL, CaCl₂ 0,292 g L⁻¹, Na₂SO₄ 0,072 g L⁻¹, TRIS C₄H₁₁NO₃ até o pH equilibrar em 7,4) (KOKUBO E TAKADAMA, 2006), que simula as condições corpóreas.

d) Equipamentos

Para a realização dos tratamentos superficiais e aquisição dos dados eletroquímicos utilizou-se um Potenciostato/Galvanostato Microquímica (MQPG – modelo 01)



Figura 11: Sistema Eletroquímico da marca Microquímica MPQG- modelo 01

Para as análises morfológicas e de interface foi utilizado o método de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva (MEV/EDS), antes e após implantação. Foi empregado um microscópio da marca Philips, modelo XL 30 a 20,0 kV.

6. 2. Métodos

a) Crescimento do Óxido por Voltametria Linear de Potencial

Os métodos de varredura de potencial são os mais utilizados para se estudar processos no eletrodo. Eles consistem na aplicação de um potencial contínua e linearmente variável ao eletrodo de trabalho, cujas espécies eletroativas sofrem processos de oxidação ou redução. Dentre suas principais aplicações estão à obtenção de informações sobre mecanismos de reações eletroquímicas, tais como: a reversibilidade de processos redox e dados semiquantitativos de parâmetros cinéticos e transporte de massa (BRETT & BRETT, 1996).

A varredura de potenciais pode ser programada de duas maneiras: varredura linear de potenciais (*Linear Sweep Voltammetry* – LSV) e voltametria cíclica (*Cyclic Voltammetry*– CV). Este método (varredura de potenciais) permite observar o comportamento da corrente em função dos parâmetros variáveis de potencial e tempo. Já a voltametria cíclica consiste na aplicação de um potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência, obtendo como resposta a corrente que migra entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo, em função do potencial. Consiste na varredura de potencial em dois sentidos: o anódico e o catódico. (Figura 12).

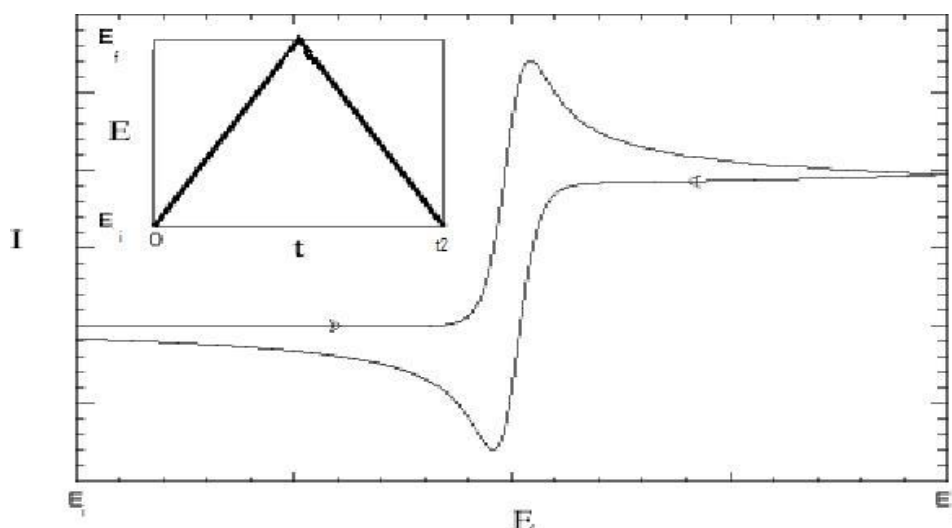


Figura 12: Voltametria Cíclica: perturbação e resposta

b) Estabilidade do Óxido por Potencial de Circuito Aberto

A medida do potencial de circuito aberto, Eca, é um experimento tradicional para o estudo da estabilidade dos óxidos em superfícies metálicas. Quando um metal é imerso em uma solução eletrolítica estabelece-se uma interface condutor/metálico - condutor/iônico caracterizada pela heterogeneidade de cargas. Como consequência, existe uma diferença de potencial entre o metal e a solução, conhecido como potencial do eletrodo que medido através do eletrodo de referência, tem-se o potencial de circuito aberto. Esse método consiste no monitoramento do potencial em relação ao tempo, por meio do qual é possível determinar o potencial de repouso e o tempo necessário para a sua estabilização, ou seja, é um método que permite avaliar o processo espontâneo de variação de potencial que o material é inserido com relação ao tempo (OLIVEIRA & GUASTALDI, 2006). Desse modo, esse processo permite estudar a tendência do material em sofrer dissolução espontânea ou passivação espontânea principalmente em meios fisiológicos por simulação (CARDOSO *et al*, 2005).

c) Formação de Hidroxiapatita pelo Método Biomimético

O mecanismo de formação de hidroxiapatita sobre as superfícies metálicas foi obtido através do método biomimético, em solução que simula os fluídos corpóreos, o SBF [solução esta apresentada na seção 6.1.1 (c)]. A solução de SBF apresenta concentrações iônicas similares ao do plasma sanguíneo como é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações iônicas da solução que simula os fluídos corpóreos (SBF) e do plasma sanguíneo humano.

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Plasma Sanguíneo Humano	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Concentração iônica em mmol/L (KOKUBO *et al* , 2006)

A seguir, é apresentado um esquema das etapas de formação de hidroxiapatita na superfície de implantes de titânio imersos em SBF (Figura 13), segundo Liu e pesquisadores (2004).

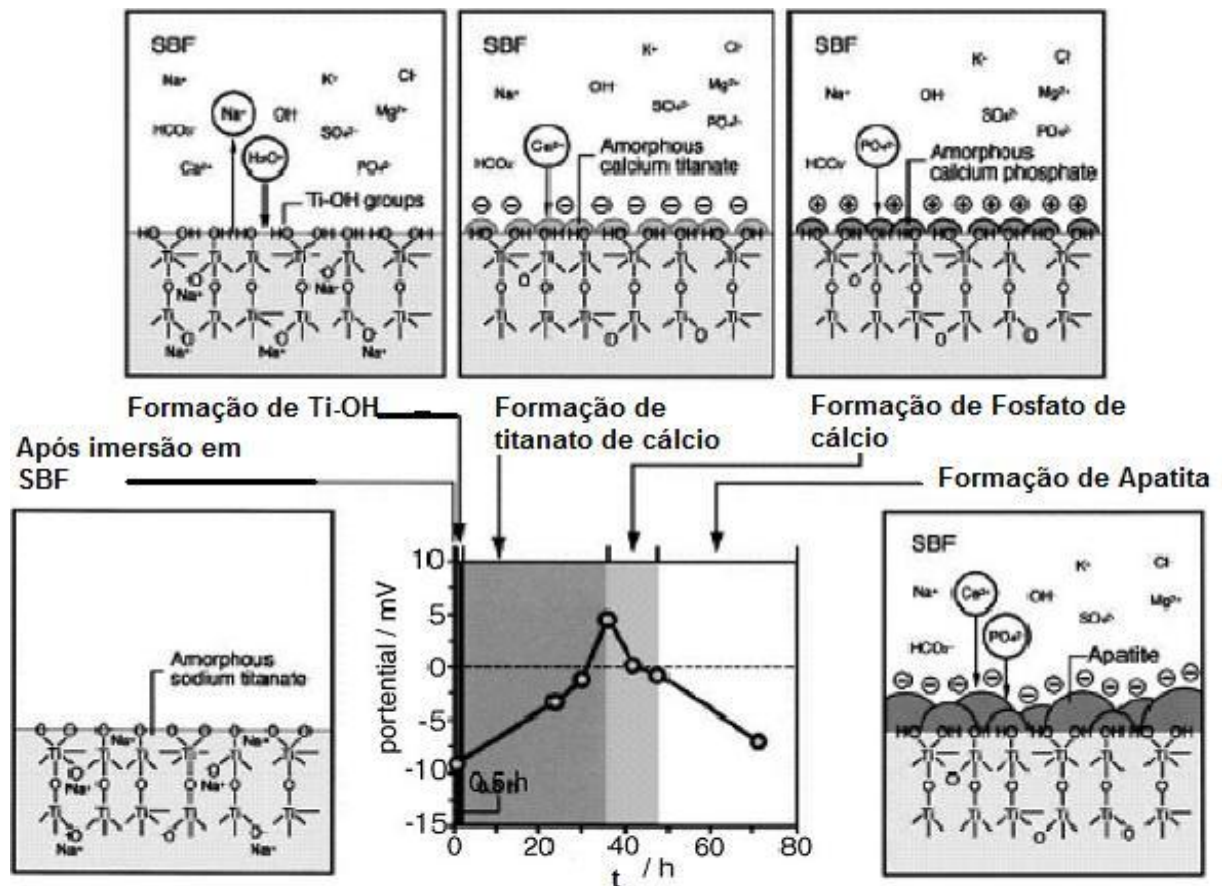


Figura 13: Esquema demonstrando as etapas da formação de apatita por meio das modificações na superfície de implantes de titânio imersos em fluido corpóreo.

A Figura 13 ilustra as mudanças na superfície do titânio quando submetidos ao tratamento alcalino com NaOH com conseqüente formação da camada de titanato de sódio e após tratamento térmico a 600°C com a formação da camada de titanato de sódio amorfo e/ou cristalino, posteriormente a imersão em SBF demonstrando a formação da camada de apatita.

Após preparação de SBF em laboratório, as amostras foram imersas e mantidas sob temperatura de 36,5°, como descrito por Kokubo (2006). O tempo estipulado para imersão foi reproduzido segundo pesquisas de Gugelmin (2009) em estudo desenvolvido pelo Grupo de Eletroquímica e Biomateriais / UFPR. Seguindo as pesquisas desenvolvidas por Gugelmin (2009), o tempo necessário para o início

da nucleação da hidroxiapatita foi de apenas 10 dias. Após este período foi observado o deslocamento da camada de hidroxiapatita sobre as superfícies do titânio.

Assim, os corpos de prova foram mantidos imersos em SBF por 10 dias e logo após foram retirados e lavados cuidadosamente com água destilada e secos em dessecador (KOKUBO *et al* , 2006).

d) Procedimento Experimental

Para caracterização eletroquímica dos biomateriais foi realizada a voltametria cíclica no sentido de varredura anódico e catódico a fim de se observar o seu comportamento eletroquímico. A faixa de potenciais empregada para a liga Ti6Al4V foi de $E_i = -1,0 \text{ V}$ à $E_f = 5,0 \text{ V}$ e para o ISO 5832-9 de $E_i = -1,0 \text{ V}$ à $E_f = 1,0 \text{ V}$, em solução de PBS, segundo condições já otimizadas por este grupo de pesquisa (MARINO, 2001).

Já o crescimento de óxido sobre a liga de titânio e do aço inoxidável na superfície foi realizado em solução de PBS utilizando o método potenciodinâmico de voltametria linear, com intervalos de potencial de $-1,0 \text{ V}$ a $5,0 \text{ V}$ para a liga de titânio e de $-1,0 \text{ V}$ a $1,0 \text{ V}$ para o aço, tendo como velocidade de varredura 50 mV/s e 10 mV/s respectivamente, em temperatura ambiente. Logo após, foi realizada a leitura de potencial de circuito aberto com duração de 60 minutos (tempo máximo) até a estabilização do potencial para comparação.

6.3. Estudo Analítico em Ratos

6.3.1 Material

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná, número 526, tendo como referencial as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação e segundo a Lei Federal nº 6638/1979 sobre pesquisas em animais, bem como seguindo as normas internacionais de ética na experimentação animal (*Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals Of*

International Association For Assessment And Accreditation Of Laboratory Animal Care) (Anexo 1).

a) Modelo Animal

Como modelo animal foi adotado ratos da linhagem *Wistar*, todos machos, com idade de 12 semanas e peso de 250 gramas, segundo norma ISO 109936 revisada. Deste modo, 60 animais provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná foram divididos em seis grupos: 2 grupos controle , 2 grupos com tratamento anódico e 2 grupos com tratamento anódico + recobrimento de hidroxiapatita (ver descrição dos grupos na Tabela 4, que apresenta a classificação dos grupos e seus respectivos tratamentos de superfície). Todos os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada, por 6 semanas, no Biotério da Universidade Federal do Paraná.

b) Mini Implantes

Foram utilizados fios da liga Ti6AL4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 (fio de Kirshner[®]) com diâmetro de 1,2 mm e 4 mm de comprimento, assim padronizados para permitir a implantação em tíbias dos ratos. A Figura 14 mostra os dois tipos de mini implantes devidamente esterilizados e utilizados neste estudo. Os fios foram esterilizados em autoclave Modelo HA, marca Sercon, por 30 minutos.

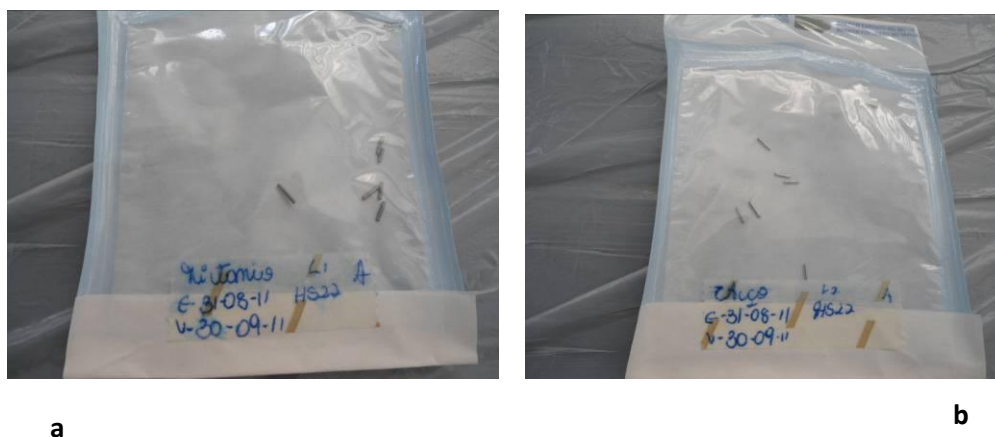


Figura 14: Embalagens estéreis contendo os mini implantes esterilizados de a) Ti6Al4V e b) Aço Inoxidável ISO 5832-9.

Foram utilizados 30 mini implantes da liga de Ti6Al4V e 30 do Aço Inoxidável ISO 5832-9, os quais foram separados em 6 grupos com 10 mini implantes em cada, conforme é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Classificação dos grupos de implantes de acordo com o tratamento superficial utilizado.

Grupos	Tratamento Superficial Recebido
A - Controle Ti6Al4V	Amostras sem tratamento
B- Controle Aço Inoxidável ISO 5832-9	
C - Ti6Al4V	Crescimento de óxidos anódicos
D - Aço Inoxidável ISO 5832-9	
E- Ti6Al4V	Crescimento de óxidos anódicos acrescido de recobrimento com hidroxiapatita
F- Aço Inoxidável ISO 5832-9	

Os implantes com superfície sem tratamento foram classificados como grupo controle, ou seja, uma referência para comparação com os demais grupos que receberam tratamento superficial.

6.3.2. Métodos

a) Tratamento Superficial nos Implantes

O crescimento dos óxidos sobre os fios da liga de titânio e do aço inoxidável foi apresentado na seção 6.2 (c). Alguns fios, como já descrito, foram imersos em SBF por 10 dias, segundo Kokubo e colaboradores (2006) e Gugelmin (2009).

b) Técnica Cirúrgica

As cirurgias foram realizadas com instrumental previamente esterilizado em autoclave por calor úmido, sendo padronizado para todos os animais. Toda a equipe cirúrgica utilizou equipamento de proteção individual (EPI); avental, luvas e máscaras.

Os animais de todos os grupos foram submetidos a anestesia através de injeção intraperitoneal de um coquetel de ketamina (95 mg/kg) e Xylazina (12 mg/kg). Após, efeito anestésico foi realizada uma tricotomia e limpeza com solução de iodo a 1% na região antero - medial da pata traseira direita, com isolamento da região do joelho através de um campo fenestrado devidamente esterilizado conforme indicado na Figura 15.



Figura 15: Isolamento da região antero - lateral média da pata traseira direita por um campo cirúrgico fenestrado.

Os acessos cirúrgicos às tíbias dos animais foram obtidos por meio de incisões longitudinais acompanhando o longo do eixo do osso tibial, de

aproximadamente 10 mm de extensão, feita com lâmina de bisturi de aço inox número 23 (Swann Morton), na região proximal e medial da tíbia. Após o afastamento dos tecidos moles e a exposição da cortical óssea, foi realizado o posicionamento da broca 1,0 mm para a perfuração.

Assim, foi realizada uma perfuração da cortical óssea com uma broca fresa de 1,0 mm, acoplada ao contra-ângulo e montada em motor elétrico cirúrgico Microprocessado, marca Adiel, modelo SR GX acoplado ao micro motor, marca kavo, de baixa rotação 16:1. (Figuras 16 e 17).



Figura 16: Equipamento com motor de baixa rotação utilizado para o defeito ósseo nas tíbias.



Figura 17: Sistema de broca e contra-ângulo

Após a realização do defeito ósseo na tíbia, segundo padronização do modelo experimental por Prado e pesquisadores (2006), foram implantados os fios da liga de Ti6Al4V e do aço Inoxidável ISO 5832-9, de acordo com cada grupo experimental e inseridos de modo que não houvesse “folga” entre o implante e o osso, sempre utilizando broca com menor diâmetro ao do implante. Todo o processo de perfuração óssea foi realizado com irrigação de soro fisiológico, a fim de evitar danos à cortical óssea, devido à elevação de temperatura durante o procedimento.

Após a inserção do fio, foi realizado cuidadoso reposicionamento do periósteo para sua localização original e feita a sutura da pele por pontos simples com fio mononylon número 4.0 preto (Procure). A seguir são apresentadas imagens das etapas desse procedimento (Figura 18).



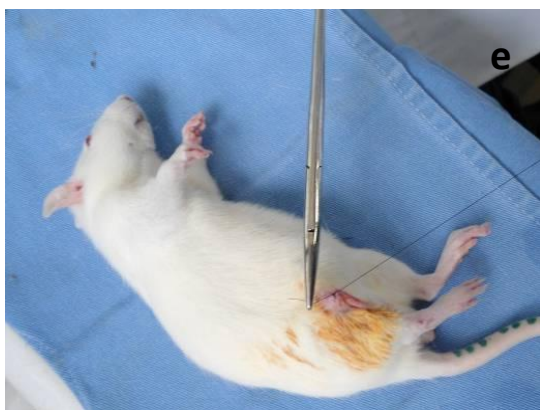


Figura 18: a) Exposição da cortical da região da tíbia do rato; b) Realização do defeito ósseo em região antero- medial da tíbia direita do rato; c) Região proximal e medial da tíbia perfurada, ou seja , com defeito ósseo; d) mini implante da liga Ti6Al4V e do Aço ISO 5832-9; e) sutura da pele.

Após o período de 6 semanas (PRADO, 2006), os animais foram submetidos à ortotanásia seguindo a Resolução 714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Para tal, foi utilizado anestésico inalatório do tipo Isoflurano, embebido em algodão e colocado em um recipiente fechado, segundo orientações da médica veterinária Érica Pedri CRMG 10. 020. Em seguida, foi realizada a retirada da tíbia por meio de dissecação. Na dissecação foi retirado tecido muscular, tendões, ligamentos e retináculos. Logo após, as tíbias foram colocadas em uma solução de formol a 10% e mantidas por 24 horas.

O descarte dos animais foi realizado em saco de lixo próprio e levado ao depósito de lixo hospitalar do biotério Central da Universidade Federal do Paraná, para posterior captação pelo serviço de lixo hospitalar da cidade de Curitiba - PR.

Após imersão em formaldeído a 10% (em massa) por 24 horas, as tíbias foram lavadas com água destilada e secas com ar comprimido. Logo após, foram colocadas em um dessecador de vidro com sílica (nova) e mantidas por 24 horas. Depois, da secagem das amostras, estas foram submetidas a desgaste ósseo (Figura 20), com uma lâmina de corte ultrafino em disco cirúrgico flexível diamantado, marca Sorensen, re. 7013 (Figuras 19). O corte para a realização do desgaste ósseo foi realizado longitudinalmente ao osso expondo o osso e o implante. A Figura 21 a mostra um imagem da tíbia após as 24h em dessecador e

antes do desgaste ósseo e a 21 b mostra uma imagem da tíbia que sofreu desgaste ósseo.



Figura 19: Disco cirúrgico flexível diamantado da marca Sorensen.



Figura 20: Desgaste da cortical óssea para exposição da interface osso/implante.

Imagens da tíbia antes e após processo de desgaste ósseo [Figura 21 (a e b)].

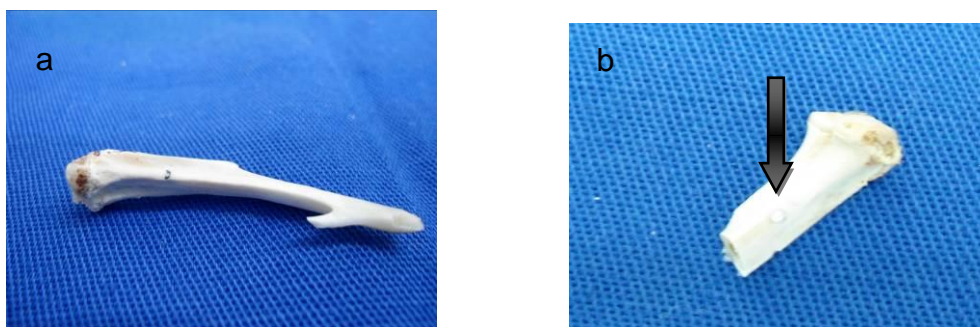


Figura 21: (a) Foto da tíbia após dessecador/24h, antes do desgaste ósseo; (b) desgaste da tíbia para exposição osso/implante.

6.3.3. Análises de Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Muitos estudos utilizam-se de microscopia óptica (PARK, 2010; YUN, 2010) para a avaliação da osseointegração, contudo sua magnificação muitas vezes não é especificada, dificultando a avaliação da imagem (LOPEZ, 2007).

A microscopia eletrônica de varredura foi inicialmente utilizada na década de 30 e vem evoluindo com o passar do tempo, e devido à sua alta resolução em alto vácuo proporcionou o entendimento da organização dos tecidos biológicos, especialmente de células, bem como tem sido muito utilizada para avaliação da interface osso/implante (ZARB, 1993, PRETTO & PGNONCELLI, 2005).

Após 6 semanas de implantação dos biomateriais, as tíbias com o implante exposto foram analisadas com ênfase na interface osso/implante. A avaliação morfológica e de elementos dos implantes foi realizada através das técnicas de caracterização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersa (EDS). Todas as análises foram realizadas em quatro pontos da interface osso/implante.

As fotomicrografias feitas por MEV e as análises feitas por EDS foram realizadas no Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento – LACTEC – em um equipamento marca Phillips, modelo XL 30 (Figura 22). Na caracterização da composição química pela técnica de EDS, foram realizadas análises na região entre o osso e o implante após visualização em lupa microscópica (Wilo Heerbrugg). Foram observadas 4 amostras de cada grupo totalizando 24 e após obtenção dos espectros foram avaliadas as distâncias entre o implante e o osso e as porcentagens atômicas (% at.) de cálcio e fósforo em cada amostra.



Figura 22: Microscópio eletrônico de varredura da marca Phillips, modelo XL 30

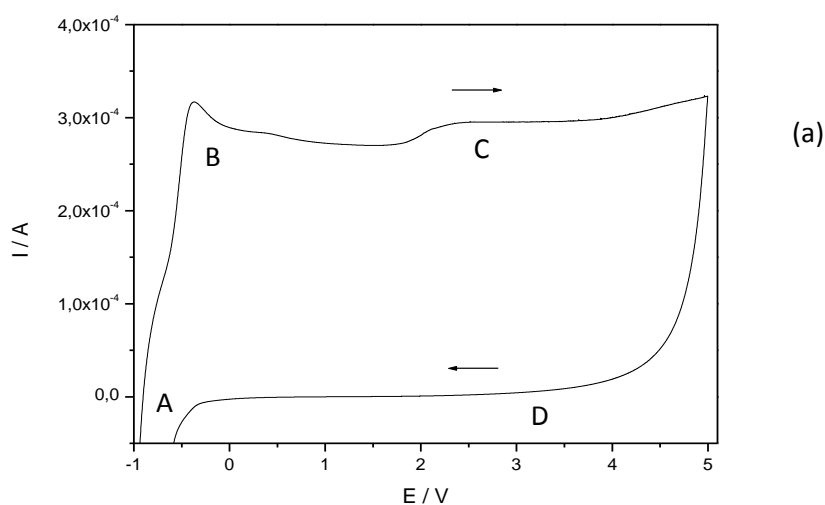
Capítulo 7

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos através das análises de caracterização eletroquímica dos biomateriais estudados – a liga de Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 – implantes usados para cirurgias ortopédicas, mostrando seus comportamentos e a estabilidade de seus óxidos. No teste *in vivo*, realizado com a inserção dos mini implantes, os defeitos ósseos de tíbias de ratos foram analisados através de MEV e EDS, para avaliação morfológica e química da formação de tecido ósseo no contato entre o osso e o implante.

7.1. Comportamento eletroquímico dos Sistemas Ti6Al4V/óxido e Aço Inoxidável/ óxido

O estudo do comportamento eletroquímico é importante para avaliação dos sistemas através do perfil voltamétrico cíclico. Este é obtido e analisado para melhor estudar o comportamento dos biomateriais em processos redox. Os voltamogramas cíclicos para os materiais estudados – liga Ti6Al4V e aço Inoxidável ISO 5832-9 estão apresentados na Figura 23 (a e b) respectivamente.



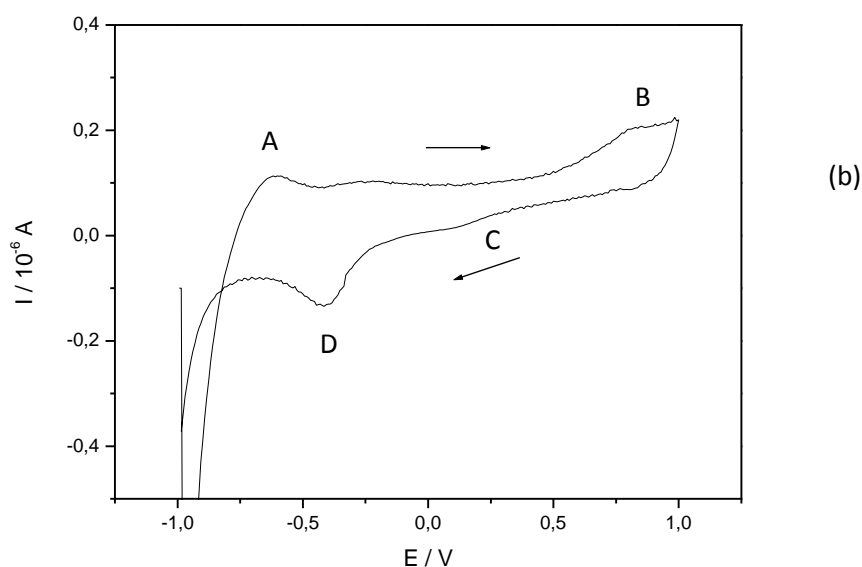


Figura 23: Voltametrias cíclicas em solução de PBS (a) VC da liga Ti6Al4V na velocidade de varredura de 50 mV/s (b) VC do aço Inoxidável ISO 5832-9 na velocidade de varredura de 10 mV/s.

Através da análise destes perfis pode-se observar o comportamento típico dos metais válvula (MARINO, 2001), quando observa-se a curva do voltamograma da liga de Titânio [Figura 23 (a)], onde observa-se um patamar de corrente referente à presença de um filme de óxido bastante estável na superfície da liga de titânio. Quando analisado o perfil no sentido inverso, ou seja, quando pode ocorrer processos de redução, observa-se a ausência de picos, o que mais uma vez caracteriza o comportamento deste grupo de metais do tipo válvula, isto é, formam-se óxido de difícil redução. A reprodutibilidade deste comportamento foi testada e comprovada através de repetições dos experimentos. Com este tipo de análise também são garantidas as condições iniciais da superfície das amostras tanto para a liga quanto para o aço inoxidável.

Na Figura 23 (a) o voltamograma foi dividido em 4 regiões de A – D. A região A consiste no intervalo de potencial inicial de -1,0 V até o potencial onde a corrente passa de catódica para anódica. A região B que se inicia a -0,55 V refere-se ao potencial onde se inicia a corrente anódica (o potencial de pico da corrente anódica) ocorrendo a oxidação dos metais e o crescimento do óxido anódico pela migração

de íons, formado preferencialmente sobre o substrato da liga de titânio. Este óxido é basicamente o dióxido de titânio (TiO_2), (Diagrama de Pourbaix- Figura 24) segundo a reação:



Observando o diagrama de Pourbaix é possível notar a grande faixa de pH e potencial onde a espécie TiO_2 é estável termodinamicamente.

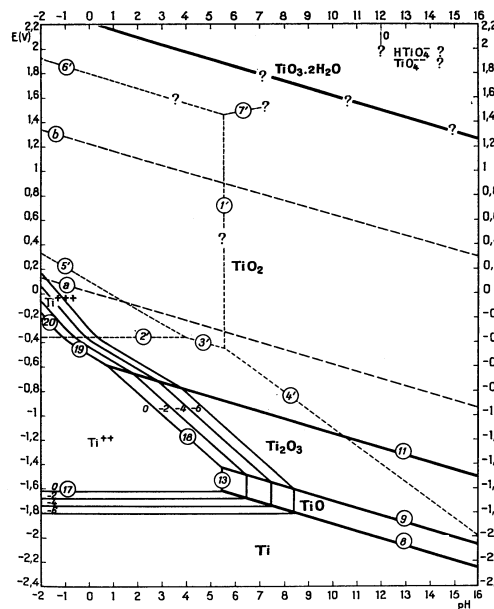


Figura 24: Diagrama de Pourbaix para o sistema Titânio em meio aquoso, (Pourbaix,1971).

O pico presente no voltamograma reflete o máximo de corrente anódica, indicando a formação de um óxido de característica protetora. A corrente permanece praticamente constante com o aumento do potencial, correspondendo à região C (Figura 23 (a)). Nessa região o biomaterial encontra-se passivo ocorrendo o aumento da espessura do filme com o aumento de potencial, segundo modelo de Alto Campo (MARINO, 2001). Já a região D caracteriza-se pela inversão do sentido

de varredura e como potencial final, o de corrente nula. Nessa região, a corrente diminui rapidamente tendendo a zero, refletindo o comportamento estável deste biomaterial que tem como característica pouca ou nenhuma redução, dos óxidos anódicos. Ao final da corrente catódica a reação é de desprendimento de hidrogênio sobre o óxido que não foi reduzido.

O voltamograma do aço inoxidável ISO 5832-9 foi dividido em 4 regiões de A - D (FIGURA 23 (b)) . Na região A, há o pico de formação dos óxidos protetores na superfície do aço inoxidável. Na região, entre A e B, ocorre a oxidação do aço com o crescimento de óxidos anódicos a base de cromo e ferro, sendo os valores de corrente muito baixos em uma ampla faixa de potencial (-1,0 V a 1,0 V) indicando o estado de passivação do biomaterial. Na região C percebe-se que o óxido não se reduz pela ausência de pico de corrente e a região D sugere o desprendimento de hidrogênio sobre o óxido que não foi reduzido totalmente.

Em síntese, há a formação de óxido de ferro basicamente o Fe_2O_3 (menos estável e menos protetor) e o crômico, Cr_2O_3 , que é mais estável e protetor contra íons agressivos (HANDBOOK, 2003). Nestas condições de potencial e eletrólito, o óxido crômico trata-se de uma película fina, da ordem de 3 nm, bastante aderente e estável, normalmente, uniforme e não poroso.

As possíveis reações de oxidação e redução são:



Principalmente forma-se o óxido crômico por causa do menor potencial ao oxigênio (Figuras 25 e 26: diagramas de Pourbaix - para o ferro e para o cromo). A seguir são apresentados os diagramas termodinâmicos do Cr e do Fe onde é observada a grande estabilidade de seus óxidos.

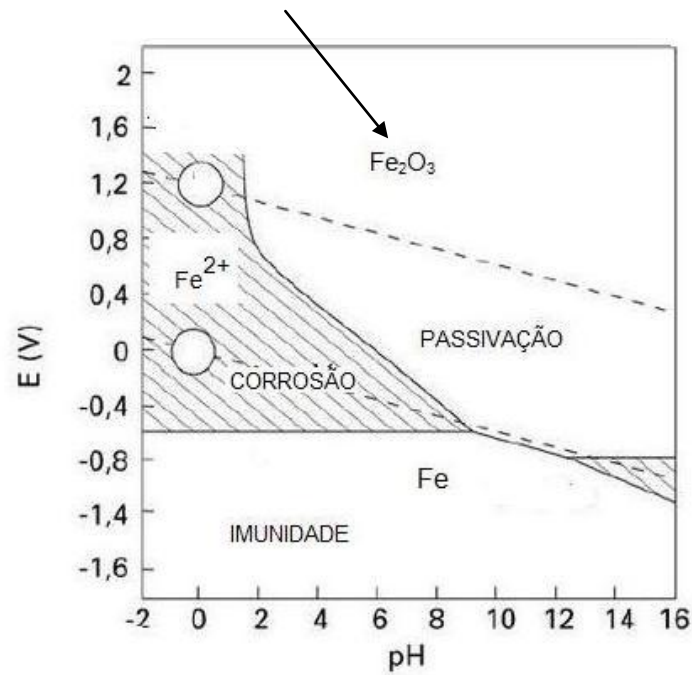
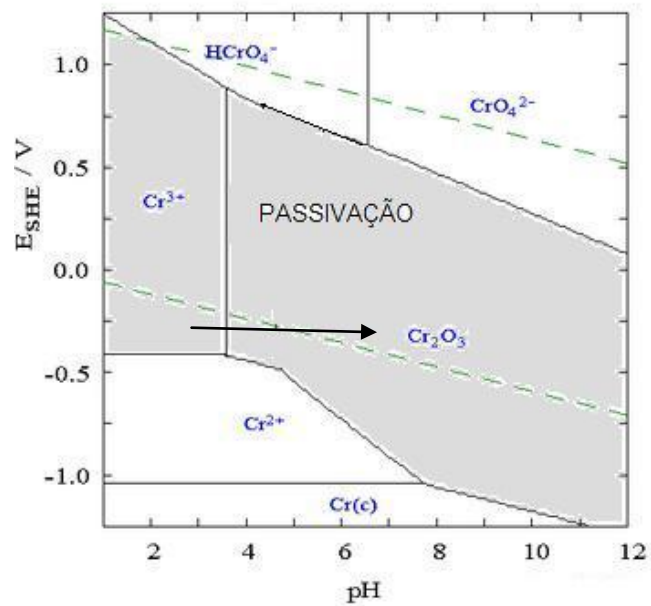


Figura 25: Diagrama de Pourbaix para o sistema ferro em meio aquoso a 25°C. (POURBAIX, 1976)



<http://www.answers.com/topic/chromium> - acesso em março de 2012

Figura 26: Diagrama de Pourbaix para o sistema cromo em meio aquoso a 25°C. (POURBAIX, 1976)

A velocidade de varredura empregada para os tratamentos eletroquímicos sobre a liga Ti6Al4V foi de 50 mV/s baseado em estudos já realizados por este grupo de pesquisa Eletroquímica e Biomateriais/UFPR e ainda esta velocidade, já otimizada, foi a mesma empregada por Gugelmin (2009). Em seus estudos, Gugelmin (2009) realizou tratamentos anódicos e simulações *in vitro* e nesta pesquisa aqui apresentada, reproduzimos os melhores tratamentos anódicos em simulações *in vivo*. Já para o aço inoxidável foram empregadas três velocidades de varredura 1mV/s, 10 mV/s e 50 mV/s em solução de PBS e os voltamogramas eletroquímicos indicaram que as correntes de pico sofriam variações de forma linear com a velocidade, bem como havia variações significativas nos valores de carga envolvidos no processo eletroquímico. Desta forma, foi empregada a velocidade de varredura igual a 10 mV/s assegurando-se assim, uma melhor definição de processos redox, da cinética química envolvida, além da concordância com trabalhos recentes na literatura (SEKERES & FALDINI, 2006).

7.2. Crescimento dos Filmes de Óxido na Superfície da liga de titânio Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9

A obtenção dos óxidos sobre as amostras de Ti6Al4V e ISO 5832-9 foram apresentadas na metodologia seção 6.2. As figuras 27 e 28 representam o processo de crescimento das películas de óxidos sobre estes metais nos diferentes parâmetros estabelecidos (faixas de potencias e velocidades de varredura).

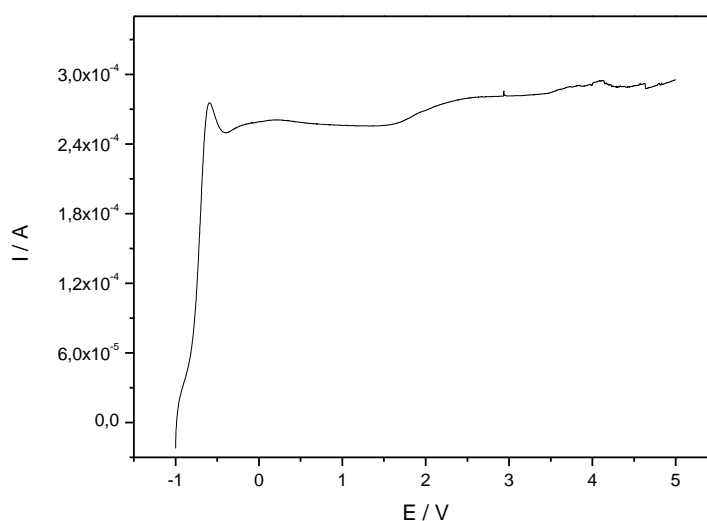


Figura 27: Varredura linear de potenciais de -1,0 V a 5,0 V, em solução de PBS na velocidade de varredura de 50 mV/s, para a liga Ti6Al4V.

Na Figura 27 observa-se o pico anódico em aproximadamente (-0,55 V) onde há crescimento de um óxido protetor e que funciona como uma barreira física entre o biomaterial e a solução. Por meio da técnica potenciodinâmica há o controle do processo de oxidação e através do método de varredura a cinética química e a eficiência do tratamento superficial realizado (processo de anodização) tornam-se mais efetivos na qualidade e quantidade do óxido obtido. Alguns estudos com óxidos de titânio obtidos modo galvanostático (corrente constante) ou potenciostático (potencial constante) indicaram a presença de uma película menos estável e uniforme (ALADJEM, 1973; CLEMENT, 1983; SUL, 2002)

O titânio reage facilmente em solução aquosa, obedecendo ao modelo de Alto Campo (seção 2.1), seguindo a reação já descrita (reação 1).

Há a hipótese, muito discutida e apresentada por vários pesquisadores, que a espécie TiOOH pode se formar além do TiO₂ (DYER, 1978; BLACKWOOD, 1988). A espécie oxi-hidroxi pode influenciar positivamente no processo de interação entre as espécies cálcio e fósforo e a película de óxido no processo de osseointegração (KOKUBO, 2006).

Após a formação deste óxido não há quase variações de corrente significativas indicando a sua estabilidade.

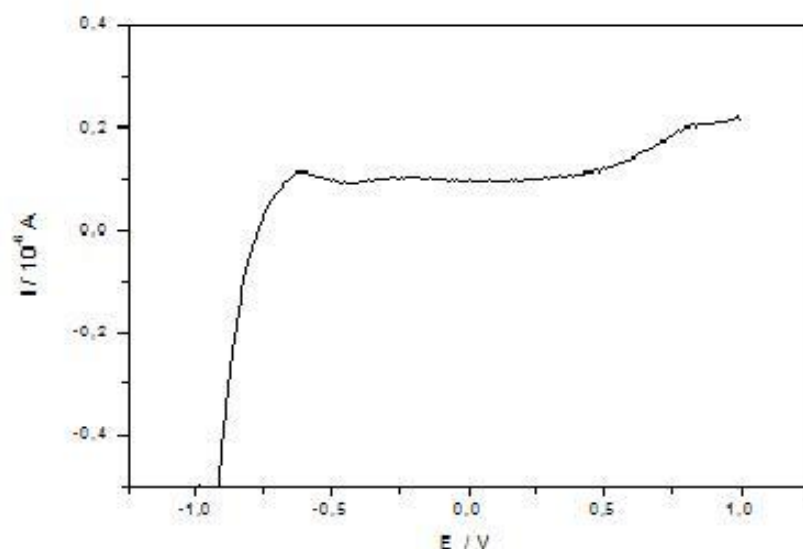


Figura 28: Varredura linear de potenciais de -1,0 V a 1,0 V, em solução de PBS na velocidade de varredura de 10 mV/s para o Aço inoxidável ISO 5832-9

A Figura 28, o pico anódico encontra-se aproximadamente a -0,7 V onde há formação do óxido de cromo e ferro, numa película fina, que após a sua formação mantém a corrente sem variação significativa demonstrando que há estabilidade do óxido sobre o biomaterial e que a propriedade protetora pode ser considerada.

Já é conhecido que o aço inoxidável ISO 5832-9 é biocompatível e possui propriedades mecânicas e de resistência à corrosão adequadas para aplicações na área da saúde (SOKEI, 2004; GIORDANI, 2007; GIORDANI, 2010), mas a interação osso/implante é um tema em estudo constante.

O óxido de cromo é o mais estável quando comparado ao de ferro, se houver interação num processo de simulação da osseointegração, esta pode ser baseada na afinidade química entre as espécies Cr/O e Ca/P. Zanin e pesquisadores (2007) em estudo sobre as variáveis de processo do mecanismo de precipitação e crescimento de hidroxiapatita em substratos de aço inoxidável ISO 5832-9 e 5832-1, através do método biomimético, observaram que as características superficiais de ambos os aços inoxidáveis foram significativas para receberem o recobrimento de hidroxiapatita. Um tratamento alcalino favoreceu a nucleação de hidroxiapatita, mas a obtenção de uma camada mais homogênea de HA só foi possível com o uso de

silicato de sódio.

Segundo Guastaldi e Aparecida (2010), o recobrimento biomimético é o único método que possibilita a obtenção de todos os fosfatos de cálcio de interesse biológico em aços inoxidáveis.

7.3. Estudo do processo de dissolução espontânea através do potencial de circuito aberto

Após o crescimento dos óxidos foi realizada a medição do potencial de circuito aberto (Eca). Através deste estudo é possível se conhecer o potencial de repouso de cada sistema e o tempo necessário para sua estabilização. Além disso, pode-se observar se há ou não a presença de processos de dissolução espontâneos, das películas de óxidos. Esta dissolução seria evidenciada por transições em perfis de potencial em função do tempo (Figura 29 – exemplo de um perfil E x t para as superfícies recobertas com óxidos de titânio).

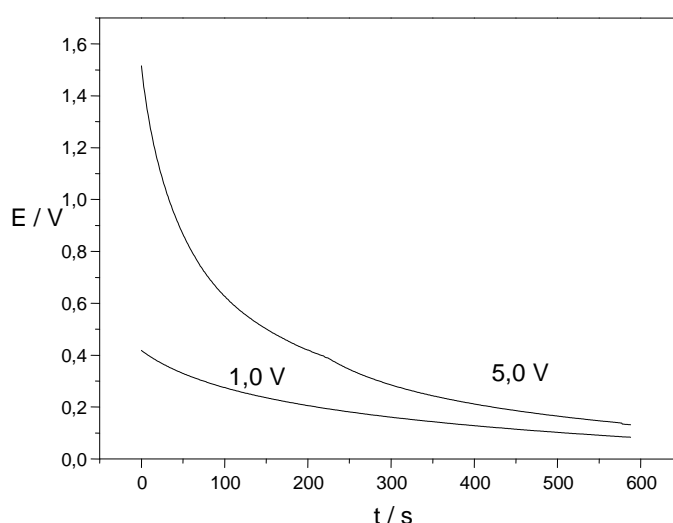


Figura 29: Tendências de curvas de potencial de circuito aberto para a liga de titânio (Ti6Al4V) recoberta com óxido crescido até 1,0 V e 5,0 V em PBS a temperatura ambiente.

Quando há a presença de um óxido na superfície, o potencial tende a decrescer rapidamente nos instantes iniciais e a seguir tende a estabilização. Para a

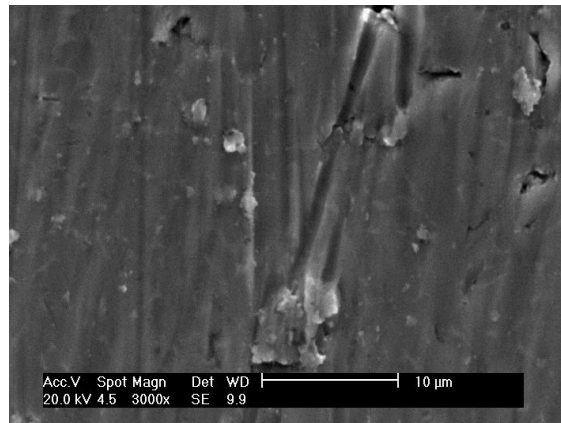
liga Ti6Al4V foi obtido um valor final de Eca, após 60 minutos (em triplicata) de 341 mV (5,0V) e para o Aço inoxidável ISO 5832-9, o valor final de – 179 mV. Desta forma, comprova-se o caráter mais protetor do filme de titânio devido ao seu maior potencial de crescimento (5,0 V) onde a película é mais espessa e além disso, sofre rearranjos estruturais e envelhecimento com perdas de moléculas de água. O potencial de circuito aberto mais positivo indica um sistema mais nobre eletroquimicamente. Cabe ressaltar, que o sistema com óxido de titânio a partir de 30 minutos já encontrava-se praticamente estabilizado em condições de circuito aberto, mesmo possuindo mais cargas para relaxarem na ausência de campo elétrico. Já para o sistema aço inoxidável ISO 5832-9/óxido (1,0 V) este atinge a estabilização próximo de 60 minutos. Este fato pode estar relacionado à menor estabilidade da película de óxido presente sob o aço inoxidável biocompatível.

Assim, através do Eca podemos observar o melhor comportamento da liga Ti6Al4V, comprovando sua característica protetora e estabilidade do dióxido de titânio.

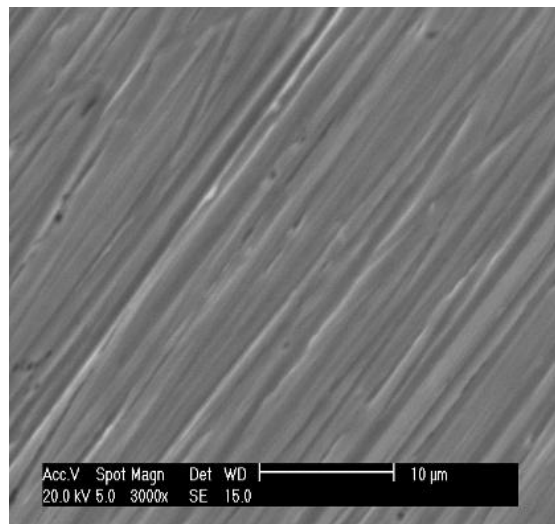
7.4. Caracterização Morfológica das Superfícies dos Corpos de Prova recobertas com óxido

As análises morfológicas das superfícies dos implantes foram realizadas antes e após a implantação. Nesta seção serão apresentadas as análises antes do procedimento cirúrgico, ou seja, antes da avaliação ossointegrativa *in vivo*.

Desta forma, analisou-se a superfície da liga de titânio Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9. As superfícies de ambos os biomateriais foram lixadas antes do crescimento dos óxidos (Figura 30). Logo após, os corpos de prova foram lavados em acetona, álcool, água destilada e secos em estufa a 36°C. Nas fotomicrografias apresentadas observa-se uma superfície rugosa com a presença nítida dos sulcos da lixa usada na preparação da superfície, sendo mais evidenciada na superfície do aço inoxidável pela propriedade desta material em ser mais resistente às deformações permanentes, referente a sua dureza (Figura 30 b).



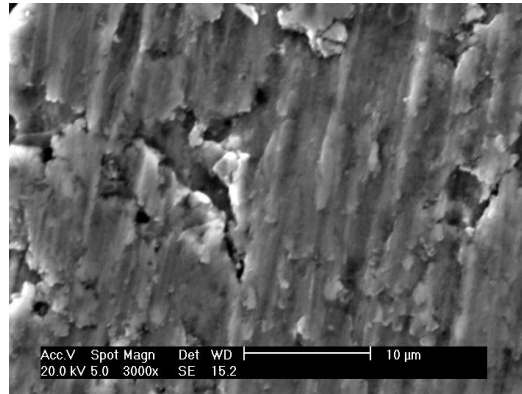
(a) Liga Ti6Al4V



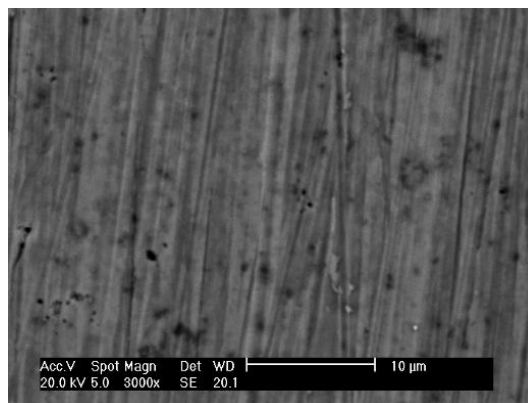
(b) Aço Inoxidável ISO 5832-9

Figura 30: Fotomicrografias das superfícies (a) liga de titânio Ti6Al4V e (b) aço inoxidável ISO 5832-9, após processo de lixamento (Aumento 3000x).

Na Figura 31 (a e b) são apresentadas as superfícies da liga e do aço acrescidas de películas de óxidos anódicos.



(a) Liga de Ti6Al4V /óxido



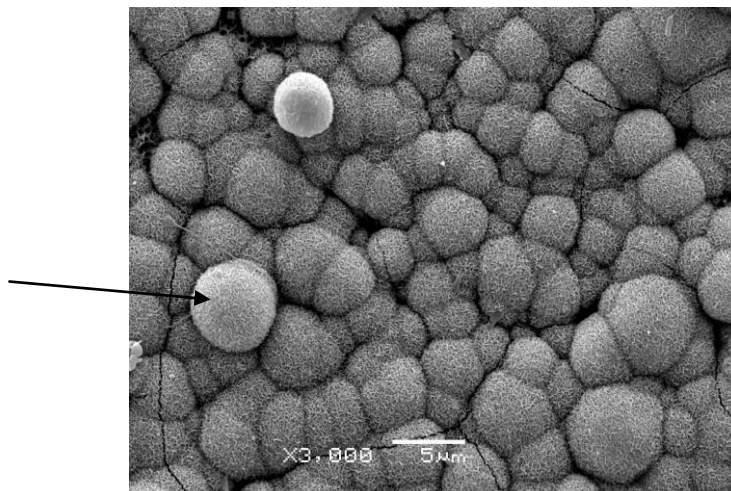
(b) Aço Inoxidável ISO 5832-9/óxido

Figura 31: Fotomicrografias das superfícies da liga Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 recobertas com óxido crescido a 5,0 V titânio (a) e 1,0 V aço (b) (Aumento 3000x)

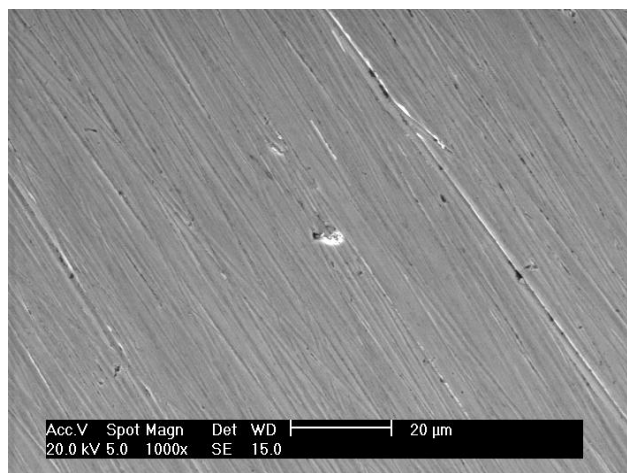
Observa-se que o óxido de titânio crescido a 5,0 V anodicamente sob o substrato a base de titânio uma distribuição mais uniforme sobre toda a superfície da amostra (MARINO, 2001), quando comparado à superfície do aço inoxidável biocompatível. Já as superfícies da liga de titânio e do aço inoxidável ISO 5832-9 apenas lixadas e após o crescimento dos óxidos anódicos, é possível observar que a diminuição da nitidez dos sulcos da lixa. Isso ocorre devido à presença do óxido superficial distribuído de forma homogênea e uniforme por toda a superfície dos

corpos de prova. Por fim, as películas de óxidos não possuem morfologia definida e se apresentam praticamente com ausência de poros.

Para o crescimento de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) sobre as superfícies de Ti6Al4V/óxido e do ISO 5832-9/óxido foi utilizado a solução SBF (*simulated body fluid*) (SBF). Esta técnica e condições foram utilizadas por terem seus parâmetros otimizados em sistema *in vitro* por Gugelmin (2009) neste grupo de pesquisa. Para Gugelmin (2009), em apenas 10 dias houve crescimento de glóbulos de hidroxiapatita na superfície dos biomateriais a base de titânio tratados anodicamente, via potenciodinâmica, demonstrando sua boa capacidade condutiva de íons de fósforo e cálcio. Assim, estabeleceu-se a análise das superfícies após imersão em SBF por 10 dias para os materiais aqui estudados [Figura 32 (a) e (b)]



(a) Liga de Ti6Al4V, acrescido de óxido, e imersa em SBF por 10 dias.



(b) Aço Inoxidável ISO 5832-9, acrescido de óxido, e imerso em SBF por 10 dias.

Figura 32: Fotomicrografias das superfícies da liga de titânio Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 recobertas com óxido crescido a 5,0 V (a) e 1,0 V (b), após imersão SBF por 10 dias (Aumento 3000x).

As fotomicrografias indicam o crescimento de hidroxiapatita após 10 dias de exposição em meio de SBF (37° C) com morfologia do tipo globular (indicado pela seta) para o sistema Ti6Al4V/óxido. Os glóbulos se distribuem com uniformidade sobre o substrato da liga de titânio. Já para o aço inoxidável não há a presença de glóbulos, que caracterizariam a presença de hidroxiapatita na superfície e, portanto, um processo de osseointegração *in vitro*. Isso quer dizer que o período de 10 dias para o teste biomimético não foi suficiente para a eficiência do processo *in vitro*. Comprovando assim, em fase preliminar, o menor grau de biocompatibilidade e de interação osso/implante, em condições similares *in vitro*, desta superfície de aço inoxidável ISO 5832-9 recoberta com óxido, obtido potenciodinamicamente até 1,0 V. Estas condições indicam que pode haver a interação entre íons de Ca e P e as espécies que compõem o óxido superficial.

Em síntese, para nossa pesquisa, as melhores condições de formação de núcleos de apatita se deram na amostra da liga de titânio quando comparado ao aço ISO 5832-9. Isso se deve à presença, provavelmente da película de TiO₂, que comprovadamente proporciona melhor afinidade química e adesão de apatita. O

TiO₂ combina com os íons OH⁻ presentes em solução aquosa, resultando na formação de espécies TiOOH (óxi-hidróxi de titânio) que proporcionam uma camada mais uniforme e homogênea de hidroxiapatita (VERCIK,2003).

7.4.1. Análise por MEV-EDS do Óxido da Liga Ti6Al4V e do Aço Inoxidável ISO 5832-9

A figura 33 mostra o espectro de EDS (Espectroscopia de Energia Dispersiva) da liga de titânio Ti6Al4V recoberta com óxido crescido potenciodimanicamente até 5,0 V, em solução de PBS e na Tabela 5 são apresentadas as porcentagens atômicas de cada elemento detectado na superfície do corpo de prova.

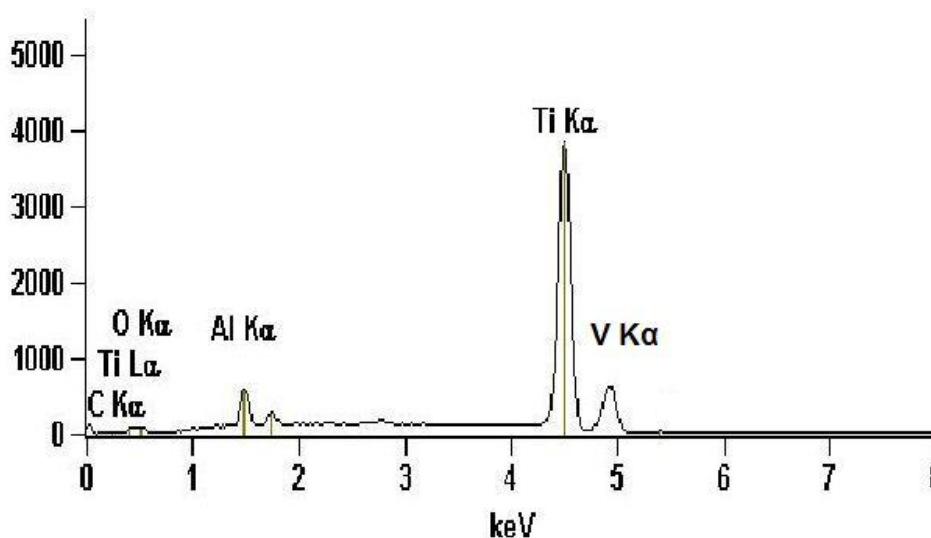


Figura 33: Espectro de EDS da Liga Ti6Al4V anodizada a 5,0 V, em solução de PBS.

Tabela 5: Porcentagem atômica dos elementos presentes na superfície da Liga Ti6Al4V

Elemento	O	Al	Ti	V
% atômica	16.85	4.23	56.19	2.04

Neste espectro, são detectados picos de maior intensidade característicos de titânio e picos de baixa intensidade associados ao alumínio e ao vanádio. Estes picos correspondem aos elementos presentes na liga Ti6Al4V. Também, pode-se observar um pico referente ao oxigênio que deve-se à presença de uma película de óxido superficial. Pela Tabela 5, onde o percentual atômico de oxigênio ficou em torno de 16%, pode-se supor que o filme de óxido presente sobre a liga de titânio é constituído essencialmente por esses elementos, ou seja, Ti e O.

Já na figura 34 mostra o espectro de EDS do aço inoxidável ISO 5832-9, recoberto com óxido crescido potenciodinamicamente até 1,0 V, em uma solução de PBS e a Tabela 6 são apresentados as porcentagens atômicas de cada elemento detectado na superfície do corpo de prova.

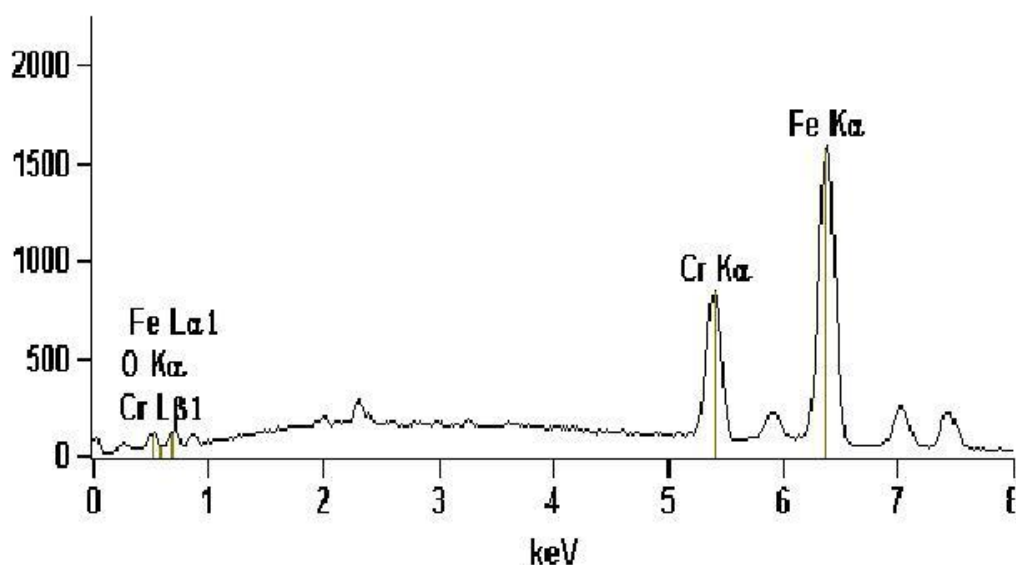


Figura 34: Espectro de EDS do Aço Inoxidável ISO 5832-9 anodizado a 1,0 V, em solução de PBS.

Tabela 6: Porcentagem atômica dos elementos químicos do Aço Inoxidável ISO 5832-9

	O	Cr	Fe
% atômica	7.58	21.03	70.48

Neste espectro são detectados picos de maior intensidade característicos de ferro e cromo e picos de baixa intensidade associados ao oxigênio. Estes picos correspondem aos elementos do aço inoxidável ISO 5832-9 e do seu óxido superficial. Pela Tabela 6, onde o percentual atômico de oxigênio ficou em torno de 7%, pode-se supor que o filme de óxido presente sobre o aço inoxidável ISO 5832-9 é constituído essencialmente por esses elementos, ou seja, Cr, Fe e O.

Por fim, observa-se o menor percentual atômico do elemento oxigênio na superfície do aço ISO 5832-9 (~7%) que na superfície da Liga Ti6Al4V em decorrência da menor espessura da película de óxido no aço (~3 nm) (HANDBOOK, 1997) que na Liga Ti6Al4V (~12,5 nm) (MARINO, 2001).

7.4.2. Avaliação osseointegrativa e comparativa entre os biomaterias a base de titânio e de aço inoxidável após intervenção cirúrgica

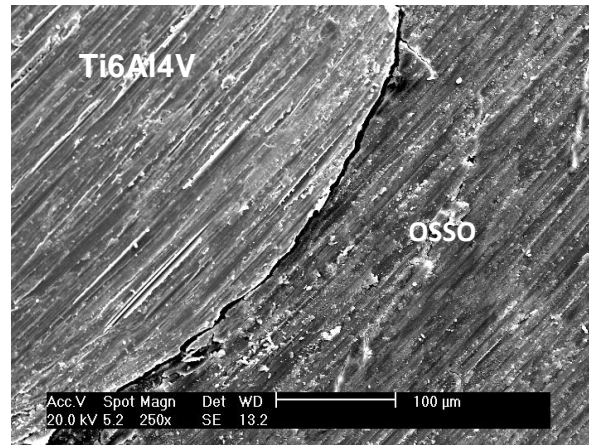
Esta seção apresenta a discussão e análise dos resultados obtidos através de dados morfológicos e semi-quantitativos dos implantes após 6 semanas de implantação no tecido ósseo de ratos. Dessa forma, nessa seção será apresentada uma imagem representativa de cada grupo e as demais imagens estarão apresentadas no Apêndice 1.

A osseointegração é uma definição originariamente apresentada por BRÅNEMARK *et al.* (1997) , como descrito no capítulo 3, onde se aponta a formação de tecido ósseo sobre o implante como um contato direto entre as duas estruturas. Atualmente, o termo ainda é muito usado por ser um processo específico de regeneração óssea (PUELO, 1999; ANSELME, 2000).

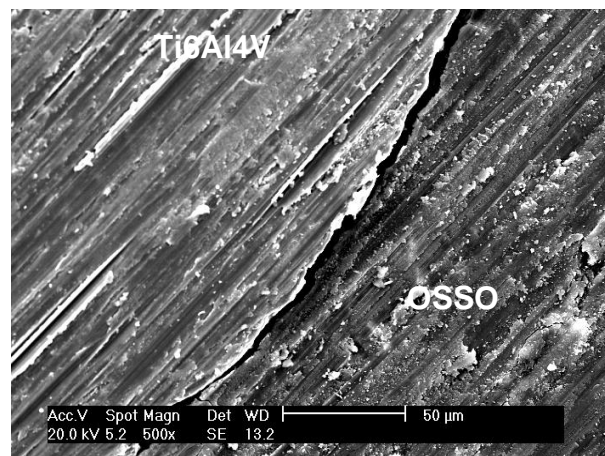
A análise microscópica através de elétrons retro – espalhados é capaz de fornecer informações relevantes sobre a aposição de tecido ósseo sobre o implante. Em muitos casos pode até substituir a análise feita através de cortes histológicos, pois evidencia o crescimento ósseo ao redor do implante em alta resolução (VIDIGAL Jr, 2002). Assim, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite uma ampliação de alta resolução quando comparado ao microscópico óptico, evidenciando a natureza da interface (HANDBOOK, 2003).

Neste estudo, aqui apresentado, os resultados após a intervenção cirúrgica foram obtidos através da observação do contato entre o metal e o osso e da formação do tecido ósseo na interface osso-implante, nas imagens obtidas através de MEV. A comparação entre os grupos foi baseada nesta análise da interface osso/implante.

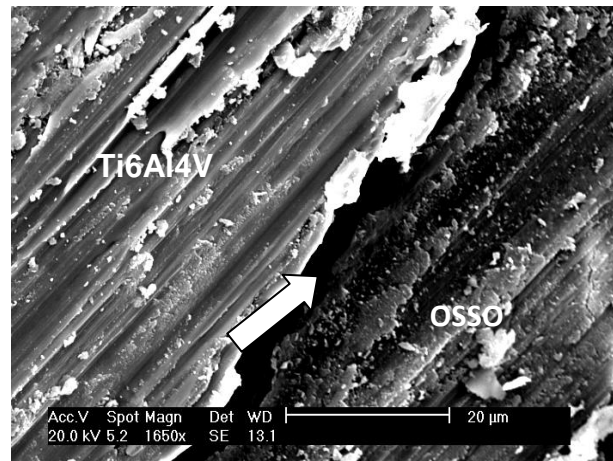
As figuras 33 (a,b,c) e 34 (a,b,c) mostram imagens dos grupos controles da liga de titânio Ti6Al4V e do aço inoxidável ISO 5832-9 respectivamente, ressaltando que estes implantes não sofreram nenhum tratamento de superfície, apenas o lixamento.



(a) Interface osso /implante da Liga Ti6Al4V. Aumento de 250x

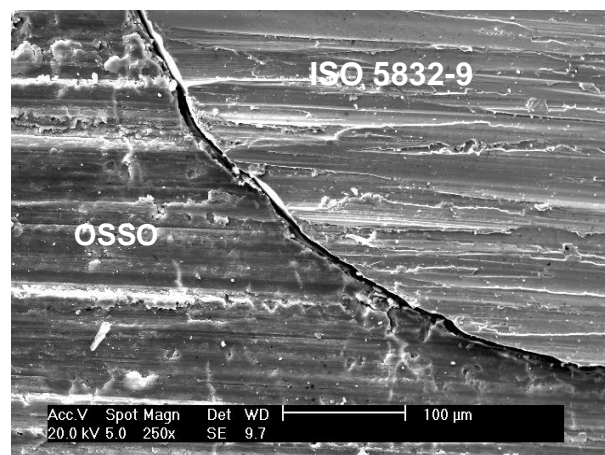


(b) Interface osso /implante da Liga Ti6Al4V. Aumento de 500x

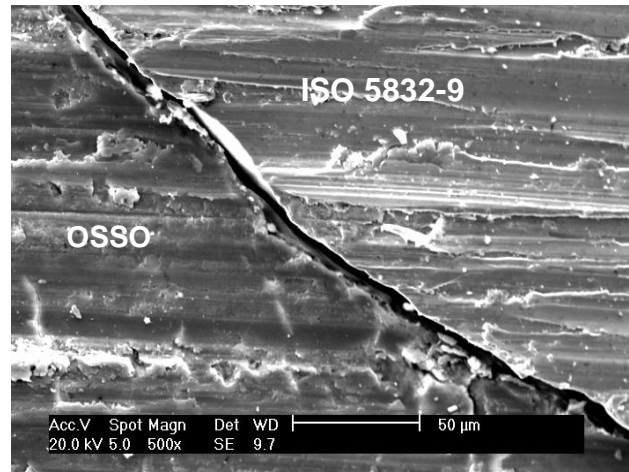


(c) Interface osso /implante da Liga Ti6Al4V. Aumento de 1650x.

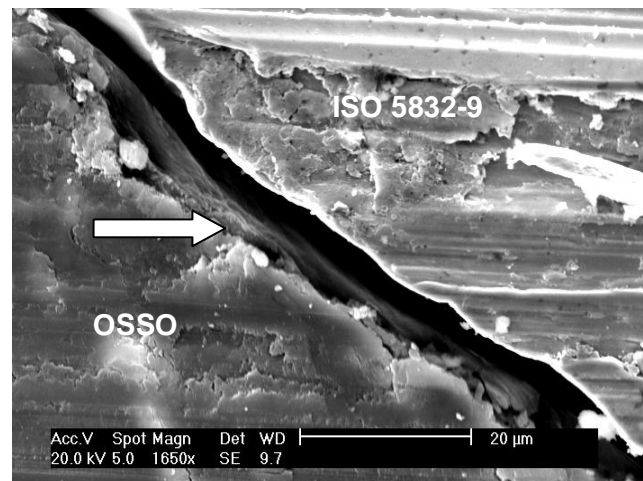
Figura 35: Fotomicrografias do grupo controle da liga Ti6Al4V sem tratamento superficial (aumentos de 250x, 500x e 1650x)



(a) Interface osso /implante Aço Inoxidável ISO 5832-9. Aumento de 250x



(b) Interface osso /implante Aço Inoxidável ISO 5832-9. Aumento de 500x.



(c) Interface osso /implante Aço Inoxidável ISO 5832-9. Aumento de 1650x

Figura 36: Fotomicrografias do Grupo controle do aço inoxidável ISO 5832-9 sem tratamento superficial (aumentos de 250 x, 500 x e 1650 x)

Por meio da análise das fotomicrografias observa-se, em ambos os grupos controle, um distanciamento (pouco contato) entre o biomaterial e o tecido ósseo. Estes “espaços” (indicados pela seta) sugerem que não houve deposição óssea ao redor do implante, sendo este fato mais evidente no grupo aço inoxidável ISO 5832-9. A distância entre o implante e o osso foi medida por meio de um software analisador de imagem da microscopia eletrônica de varredura. Estas distâncias

estão indicadas por setas na Figura 35 (c) e na Figura 36 (c) que se referem ao aço inoxidável e a liga Ti6Al4V, respectivamente. A avaliação deste contato numa análise semi-quantitativa é bastante representativa e corrobora com as análises das imagens.

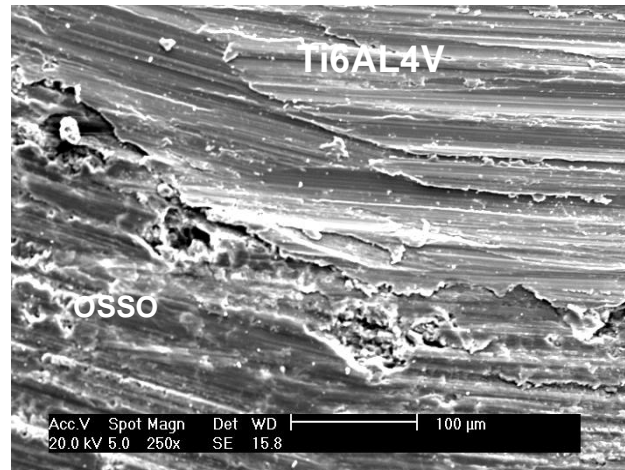
Na Tabela 7 estão apresentados os valores médios desta distância biomaterial/osso para o grupo controle.

Tabela 7: Distanciamento entre os biomateriais e o osso para o grupo controle:

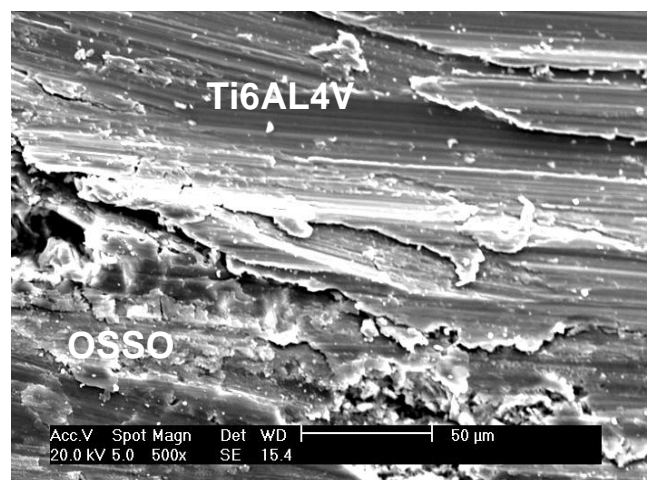
Biomaterial	Distância da interface/ μm
Ti6Al4V	3,48 μm
ISO 5832-9	6,97 μm

Desta forma, observa-se a maior interação e contato do implante da liga Ti6Al4V com o osso tibial do rato, sendo aproximadamente 50% menor a distância nesta interface. Segundo Alberktsson (1987) quanto maior o espaço entre o implante e o osso, maior é a evidência de que não houve osseointegração.

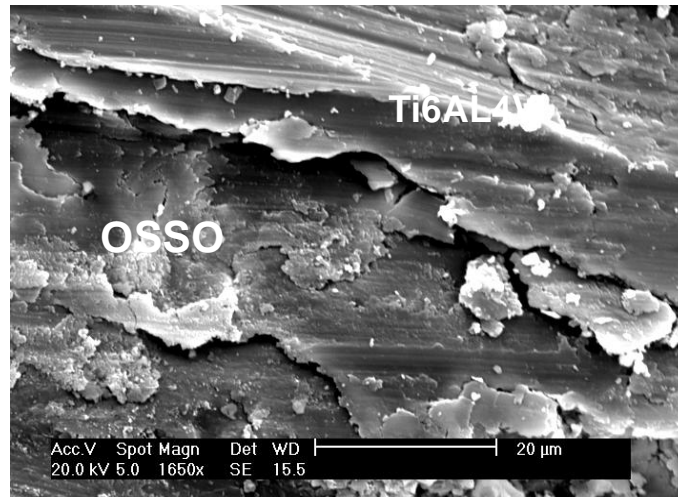
As Figuras 37 e 38 apresentam as imagens por MEV dos grupos que receberam tratamento superficial através da técnica eletroquímica potenciodinâmica, onde foram crescidos óxidos anódicos sobre as superfícies da liga Ti6AL4V (até 5,0 V) e do ISO 5832-9 (até 1,0 V).



(a) Interface osso/implante da Liga Ti6Al4V / óxido, crescido a 5,0 V. Aumento de 250x.

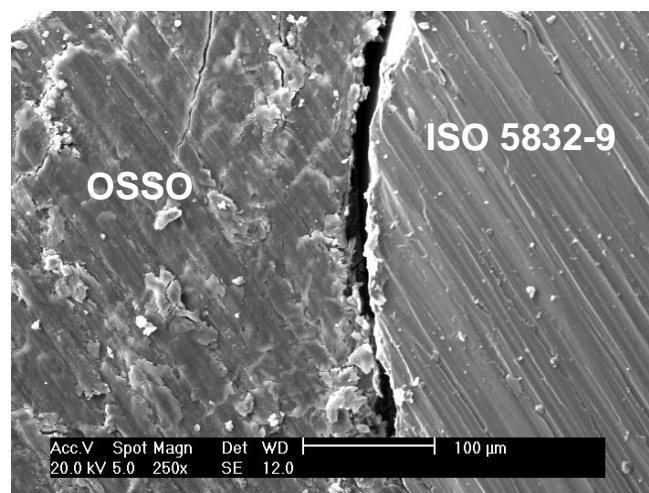


(b) Interface osso/implante da Liga Ti6Al4V / óxido, crescido a 5,0 V. Aumento de 500x.

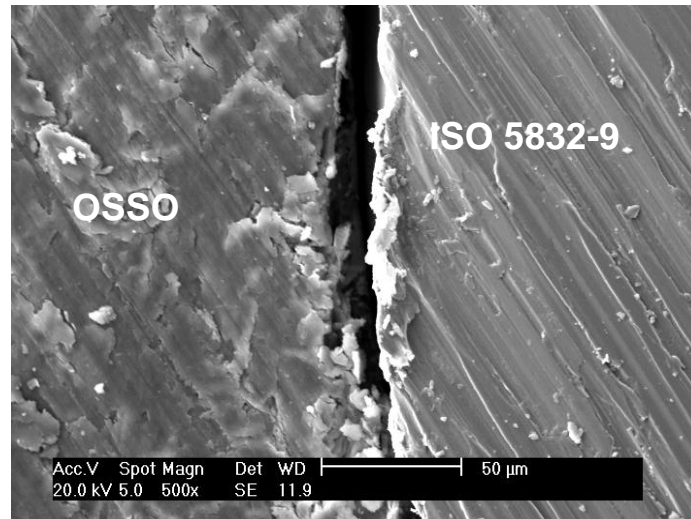


(c) Interface osso/implante da Liga Ti6Al4V / óxido, crescido a 5,0 V. Aumento de 1650x

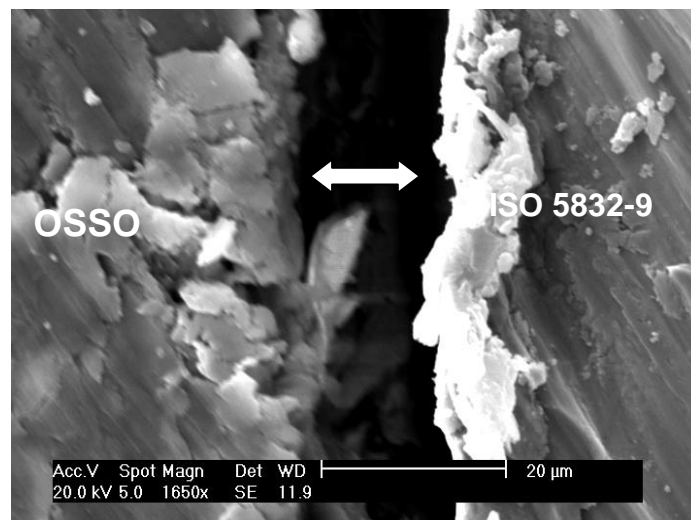
Figura 37: Fotomicrografias do Grupo C (Tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico a 5,0 V sobre o substrato da Liga Ti6AL4V (aumentos de 250x, 500x e 1650x)



(a) Interface osso/implante do Aço Inoxidável ISO 5832-9/ óxido, crescido a 1,0 V. Aumento de 250x.



b) Interface osso/implante do Aço Inoxidável ISO 5832-9/óxido, crescido a 1,0 V
Aumento de 500x



c) Interface osso/implante do Aço Inoxidável ISO 5832-9/óxido, crescido a 1,0 V.
Aumento de 1650x.

Figura 38: Fotomicrografias do Grupo D (tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico a 1,0V, sobre o substrato do Aço Inoxidável ISO 5832-9 (aumentos de 250x, 500x e 1650x)

Com base nas análises das imagens observa-se algumas variações entre os grupos aqui apresentados. Apesar de ambos terem recebido o mesmo tratamento superficial através da técnica eletroquímica de crescimento de óxidos potenciodinâmicos, o grupo Ti6Al4V teve uma resposta biológica melhor quando comparado ao grupo aço.

No grupo C (Liga Ti6AL4V / óxido) observa-se a presença de tecido ósseo mais maduro e uma matriz óssea uniforme e que cresce sobre o implante e sem apresentar espaçamento entre o biomaterial e o tecido duro. Já o Grupo D (Aço 5832-9/ óxido) apresenta um espaçamento de interface implante /osso de aproximadamente $\sim 9,2 \mu\text{m}$ de distância do osso/implante.

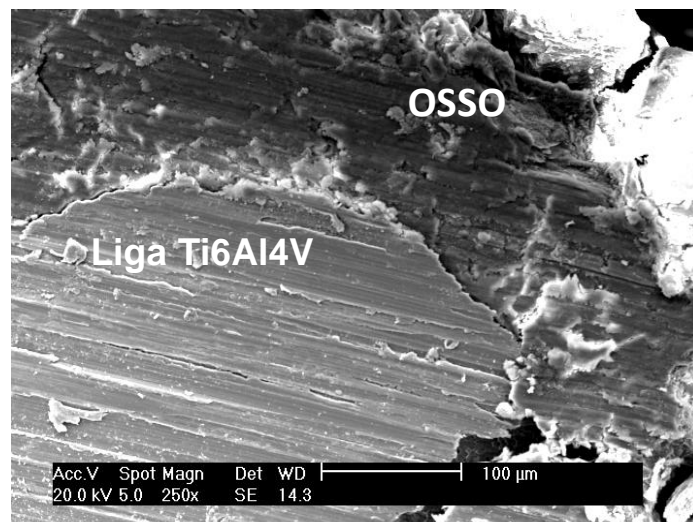
Esse resultado pode indicar que não houve contato íntimo na interface e portanto, não houve crescimento de tecidos ósseos novos mostrando assim, uma baixa eficiência no processo de osseointegração de aços ISO 5832-9 recobertos com óxidos potenciodinâmicos. Com relação a liga, além de haver o contato efetivo, o tecidos ósseos neoformados cresceram sobre o implante metálico de titânio proporcionando uma blindagem do sistema osso/implante. Segundo alguns autores (YUN, 2010; ZHU, 2002), a presença de um óxido anódico pode ter um efeito positivo na proliferação e adesão de células. Desta forma, neste estudo, os óxidos obtidos via potenciodinâmica podem estar tornando o processo de osseointegração mais eficiente.

No recente estudo de YU e colaboradores (2010) foi observado que a nanoestrutura de TiO_2 , obtida por anodização via potenciostática em solução ácida, tem uma boa bioatividade no crescimento de células ósseas, ou seja, favorece a adesão, proliferação e diferenciação de células osteoblásticas sobre o implante. Já Franco e colaboradores (2008), indicaram uma tendência para a ocorrência de osteogênese de contato na superfície de titânio que recebeu tratamento eletroquímico (eletrodeposição de elementos de Ca e P) em um modelo experimental (cães). A média de contato osso-implante variou de 2,3% a mais dos que não foram eletrodepositados.

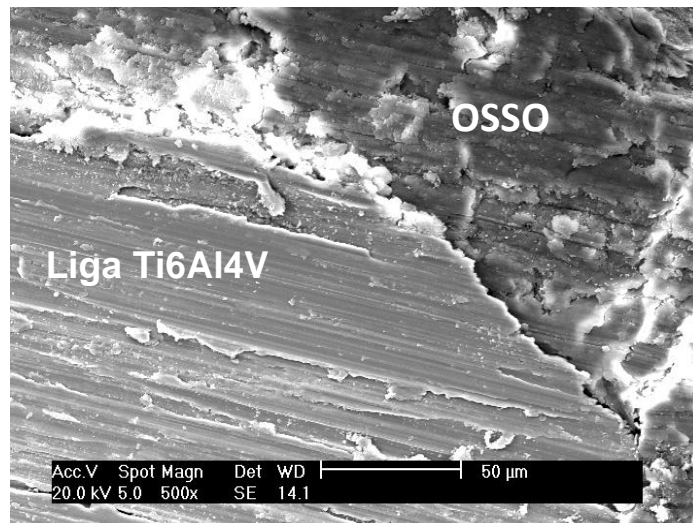
Estes resultados apontam para uma concordância nos resultados deste estudo, onde o grupo Ti6Al4V/óxido mostrou uma melhor resposta do tecido ósseo ao longo do implante, quando comparado à esta liga sem tratamento (grupo

controle) e também quando comparado ao aço inoxidável ISO 5832-9. Cabe ressaltar aqui que nesta pesquisa tratam-se de óxidos obtidos com um melhor controle de parâmetros eletroquímicos, como potencial e corrente (cinética química) e em condições de experimento bastante simples e brandas e ainda amplamente reproduzíveis. Em síntese, óxidos potenciodinâmicos crescidos até 5,0 V, em solução fisiológica, com espessura de aproximadamente 12,5 nm (MARINO,2001) e sendo basicamente TiO_2 conferem ao implante um melhor contato com o osso, ou seja, uma melhor osseointegração *in vivo*. Também cabe ressaltar, que esta película de óxido, obtida nas condições descritas acima, além de melhorar a resistência à corrosão (ausência de contaminações) do biomaterial confere a este melhor resistência à fadiga.

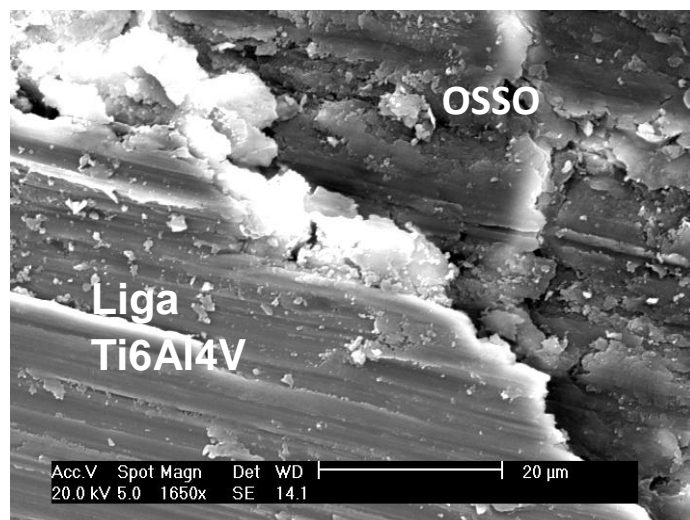
Por fim, as Figuras 39 e 40 apresentam as imagens dos grupos que receberam tratamento superficial através da técnica eletroquímica potenciodinâmica, onde foram crescidos óxidos anódicos sobre as superfícies da liga Ti6Al4V (até 5,0 V) e do ISO 5832-9 (até 1,0 V) e também a imersão em SBF pelo período de 10 dias, ou seja, após interação com os íons de cálcio (Ca^{2+}) e fósforo (P^{5+}).



(a) Interface osso/implante da Liga Ti6Al4V / óxido (5,0 V) após imersão em SBF por 10 dias. Aumento de 250x.

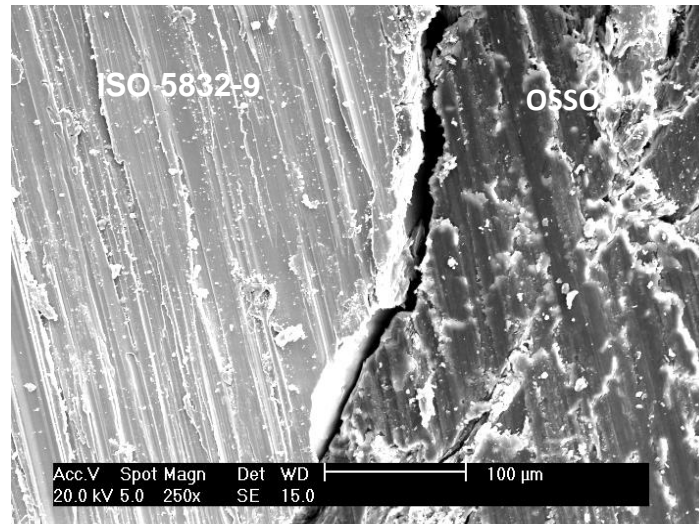


(b) Interface osso/implante da Liga Ti6Al4V / óxido (5,0 V) após imersão em SBF por 10 dias Aumento de 500x

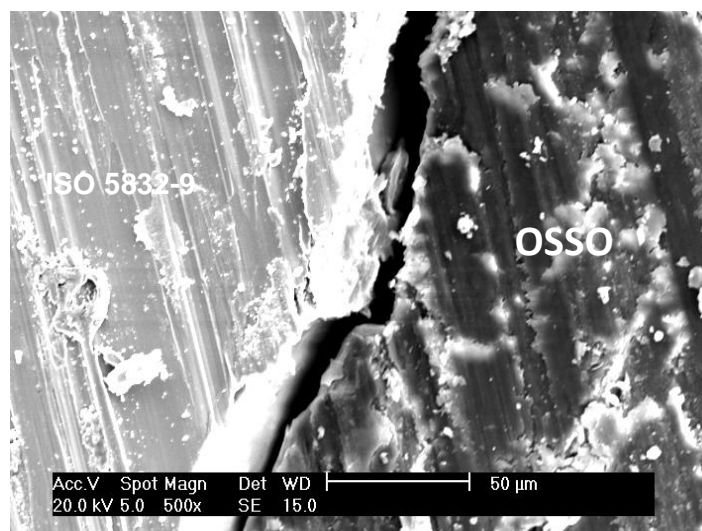


(c) Interface osso/implante da Liga Ti6Al4V / óxido (5,0 V) após imersão em SBF por 10 dias. Aumento de 1650x.

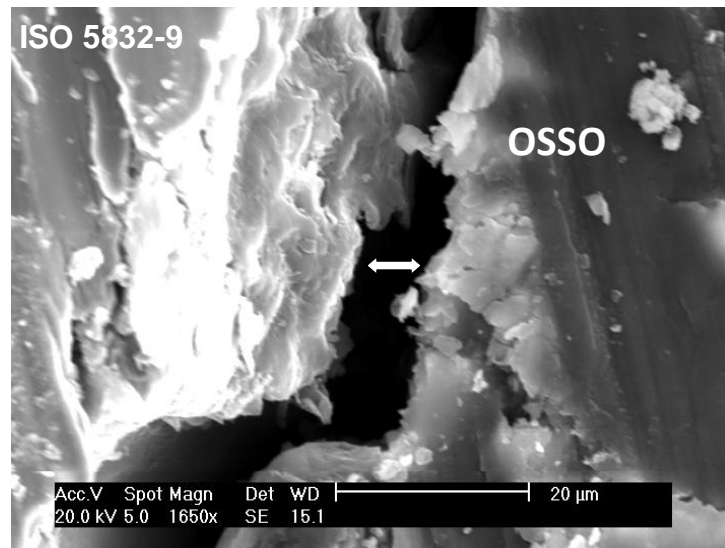
Figura 39: Fotomicrografias do Grupo E (Tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico (até 5,0 V), sobre o substrato da liga Ti6AL4V e após imersão em SBF por 10 dias (aumentos de 250x, 500x e 1650x)



(a) Interface osso/implante do Aço Inoxidável ISO 5832-9/ óxido (1,0V) após imersão em SBF por 10 dias. Aumento de 250x.



(b) Interface osso/implante do Aço Inoxidável ISO 5832-9/ óxido (1,0 V), após imersão em SBF por 10 dias. Aumento de 500x.



(c) Interface osso/implante do Aço Inoxidável ISO 5832-9/ óxido (1,0 V), após imersão em SBF por 10 dias. Aumento de 1650x.

Figura 40: Fotomicrografias do Grupo F (Tabela 4), onde houve crescimento de um filme de óxido anódico (até 1,0 V) sobre o substrato do Aço Inoxidável ISO 5832-9 e após imersão em SBF por 10 dias (aumentos de 250x, 500x e 1650x)

Neste grupo, onde os implantes foram submetidos à interação com os íons Ca e P, de uma solução que simula fluídos corpóreos pelo método biomimético durante 10 dias, pode-se observar um comportamento similar ao do Grupo C (liga Ti6Al4V/óxido) e do Grupo D (aço ISO 5832-9/óxido). Isso quer dizer que, no grupo da liga de titânio há a presença de osso mais maduro e poucos espaços entre a matriz óssea e o implante, após 6 semanas de implantação em tíbias de ratos. Novamente, os tecidos ósseos novos cresceram sobre o implante metálico de titânio e o mesmo fato não ocorre quando o implante trata-se do aço inoxidável ISO 5832-9, mesmo que este implante esteja recoberto com óxido potenciodinâmico e também, mesmo após a imersão em solução contendo íons de Ca e P.

Sul (2003) avaliou implantes de titânio inseridos em coelhos por 6 semanas, como nesta pesquisa. Os implantes foram divididos em controle e testes, onde estes últimos receberam tratamento superficial através da técnica eletroquímica de micro-

arco, via galvanostática, formando uma camada de óxido espessa na superfície e em seguida, imersos em soluções agressivas de ácido sulfúrico, ácido fosfórico e de cálcio, dividindo os grupos contendo íons fósforo, cálcio e enxofre. Foi observado que as superfícies submetidas ao contato com elementos bioativos como Ca e P, tinham uma conexão estrutural e funcional mais efetiva com o tecido ósseo.

Nesse contexto, os grupos de análise *in vivo* que se destacam são os C e E, ou seja, os grupos dos implantes de Ti6Al4V recobertos com óxidos potenciodinâmicos (Figura 37) e dos implantes de Ti6Al4V recobertos com um óxido potenciodinâmico e hidroxiapatita (Figura 39).

Nestas condições houve um processo mais eficiente de blindagem na osseointegração com crescimento de tecido ósseo novo sobre o implante metálico de titânio. As distâncias entre o implante e o osso para os sistemas Ti6Al4V\óxido (5,0 V) e Ti6Al4V\óxido (5,0 V)\ HA (SBF) não foram mensuradas devido ao completo contato na interface (Tabela 8).

Tabela 8: Distanciamento entre os biomateriais e o osso para os grupos biomaterial/óxido e biomaterial/óxido/HA:

Biomaterial	Distância da interface/ μm
Ti6Al4V/óxido	0,0
ISO 5832-9/óxido	9,2
Ti6Al4V/óxido/HÁ	0,0
ISO 5832-9/óxido/HÁ	7,1

Por fim, pode-se concluir que não há necessidade de uma ativação da superfície com o procedimento de imersão em SBF para a obtenção da hidroxiapatita. Isso quer dizer que, apenas o óxido crescido potenciodinamicamente até baixos potenciais (em torno de 5,0 V) sobre a liga ortopédica torna melhor o contato implante/osso e, portanto torna mais eficiente o processo de osseointegração *in vivo*.

Já o aço Inoxidável biocompatível ISO 5832-9\óxido potenciodinâmico possui

baixa eficiência do processo de osseointegração, em 6 semanas de implantação. Como hipótese, a interação implante\osso poderia melhor estabelecer-se em um período maior de implantação, contudo para experimentos com modelos animais de pequeno porte, como em nossa pesquisa, em ratos, 6 semanas reproduz o potencial osteogênico do material em teste (PRADO, 2006). Já a ativação da superfície recoberta com óxido potenciodinâmico em contato com íons Ca e P (por 10 dias) foi eficiente, pois diminuiu a distância física entre o implante metálico do aço inoxidável\óxido, ou seja, sem a ativação a distância mensurada foi de aproximadamente $\sim 9,2 \mu\text{m}$ e com a ativação foi de $\sim 7,12 \mu\text{m}$ nas superfícies recobertas com óxido anódico obtido via potenciodinâmica até 1,0 V. Alguns estudos (VIDIGAL Jr *et al*, 1999; ALLEGRIINI Jr *et al*, 2005; LAKSTEIN *et al*, 2009; entre outros) relataram uma melhora na osseointegração quando o implante de aço inoxidável tipo 316L e\ou ISO 5832-9, possui um tratamento superficial associado ao recobrimento biomimético, maior que o período de 10 dias . Isto se deve à força de adesão e ligação óssea que ocorrem quando as superfícies são bioativas (PATTANAYAK, 2011).

A análise da razão Ca/P, muito comum em estudos da avaliação da osseointegração, é realizada apenas em testes *in vitro* e normalmente emprega-se técnicas como Espectroscopia de Energia Dispersiva e\ou Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X (XPS). Nesta pesquisa foi realizada uma tentativa de determinação desta razão para os testes *in vivo*, mas as sondas do equipamento de EDS (aqui empregado) possuem limitações na análise de áreas/regiões muito pequenas, ou seja, na ordem de poucos nanômetros.

A fórmula química da hidroxiapatita é dada por $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, contudo geralmente é escrita como $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, assim pode-se perceber que uma unidade cristalina contém duas dessas entidades na forma em que ocorre naturalmente no corpo humano. Essa fórmula química mostra que a razão entre átomos de Ca e P é de 1,67. Essa unidade é importante como indicativo do crescimento de osso em uma dada superfície em condições simuladas. Quanto mais próxima desse valor a razão entre os elementos bioativos em ambientes *in vitro*, maior será a possibilidade de osseointegração e, portanto, de crescimento de um novo tecido ósseo ao redor do implante. Contudo, como já foi mencionado, esta

razão é dada para *testes in vitro* como parâmetro para análises da bioatividade superficial e, portanto, da razão Ca e P.

Capítulo 8

CONCLUSÕES

Os óxidos crescidos potenciodinamicamente, tanto para a liga Ti6Al4V (5,0 V) quanto para o aço inoxidável ISO 5832-9 (1,0 V), demonstraram ser estáveis e protetores sobre as superfícies estudadas. Contudo, o dióxido de titânio (TiO_2) apresentou melhores características protetoras observadas tanto na voltametria cíclica quanto em circuito aberto, evidenciando seu caráter nobre. Essa característica sugere que através de MEV onde o dióxido de titânio apresenta-se mais uniforme e homogêneo quando comparado ao aço. Já quando são submetidos ao teste de imersão biomimético (SBF), a liga Ti6Al4V apresenta formação de glóbulos de hidroxiapatita sobre toda a superfície em apenas 10 dias de imersão, ao contrário, das superfícies do aço inoxidável ISO 5832-9 onde há a ausência desta espécie. Enfim, com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que a liga Ti6Al4V quando comparada ao aço inoxidável ISO 5832-9, tem um comportamento eletroquímico mais estável e controlável para aplicações na área da saúde, e deste modo, comportou-se como um biomaterial resistente aos processos corrosivos em fluidos corpóreos pelos testes *in vitro*.

Após a implantação em animais, as superfícies com melhor resultado de deposição de matriz óssea ao redor do implante foram as anodizadas, independente do recobrimento biomimético que, por sua vez, pode conferir uma maior ativação das células osteoblásticas. Neste grupo de análise *in vivo* foi observado o crescimento de tecido ósseo sobre o implante metálico, proporcionando uma blindagem completa. Já para o aço inoxidável houve uma baixa interação osso-implante onde o distanciamento na interface ficou em torno de 9,2 μm .

Estes resultados apontam para a eficiência do método eletroquímico potenciodinâmico em solução fisiológica (condição significativamente mais branda) tanto *in vitro* quanto *in vivo* que por sua vez tem como características: o controle mais preciso dos parâmetros eletroquímicos, fácil aplicação, ausência de contaminação e reduzido tempo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALADJEM V. **Corrosão**. Ed. Guanabara, 2ª ed, RJ, 1982.

ALDEN, J. **Computation Electrochemistry**. Oxford University, Disponível em <<http://compton.chem.ox.ac.uk/john/Thesis/index.html>>. acesso em março de 2012.

ALBREKTSSON, T. The Response Of Bone To Titanium Implants. CRC: **Crit. Rev. Biocompatibility**. v. 1, p. 53 –84, 1985.

ALBREKTSSON, T.; JACOBSSON, M. Bone-metal interface in osseointegration. **J. Prosthet. Dent.**, St Louis, v. 57, n. 5, p. 597-607, May 1987.

ALLEGRI S. RUMPEL E.; KAUSCHKE E.; FANGHANEL J.; KONIG B. Hydroxyapatite grafting promotes new bone formation and osseointegration of smooth titanium implants. **Ann of Anat**, 143-151, 2006.

AMADEI S.U; SILVEIRA V.A.S.; PEREIRA A.C.; CARVALHO R.F.; ROCHA R. F. A Influência da Deficiência Estrogênica No Processo de Remodelação e Reparação Óssea. Effect Of Estrogen Deficiency On Bone Turnover And Bone Repair. **J Bras Patol Med Lab** .v. 42 . n. 1 . p. 5-12 , fevereiro, 2006.

AMARANTE E. S & LIMA L. A. Otimização Das Superfícies Dos Implantes: Plasma De Titânio e Jateamento Com Areia Condicionado Por Ácido. Estado Atual. **Pesqui Odontol Bras**, 15(2), 166-173, 2001.

ANSELME, K., Osteoblast adhesion on Biomaterials. Review. **Biomaterials**, 21, 667-681, 2000.

ASM International, **Handbook Corrosion**, Nith Edition, vol. 13, 1987.

ATTAIA Y.A, FUERSTENAU D.W. The equilibrium composition of hydroxiapatite and fluorapatite-water Interfaces. **Colloids and Surfaces**. 34 (3), 271-85, 1988.

AVÉS E. P., GALVÁN J. C., LIMA I. R., GRANJEIRO J. M., BASTOS I. N., SOARES G. D. Recobrimento da Liga Ti-6Al-4V Com Hidroxiapatita Pelo Método Sol-Gel e Sua Aplicação a Hastes Femorais Não-Cimentadas. **Cerâmica**, 54, 476-4, 2008.

BLACKWOOD, D..J. & PETER L.M. The influence of growth rate on the properties of anodic oxide films on titanium. **Electrochimica Acta**, 34, 1505, 1989.

BOYER R. R. Titanium and Titanium Alloys. **Metals Handbook**. 9ed. NY: ASM-international, v.2, p. 458-475, 1979.

BRÄNEMARK, P.-I.; HANSON, B. O.; ADELL, R. e colaboradores. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, v. 11, supl. 16, p. 122-132, 1977.

BRÄNEMARK, P. I. Introduction to Osseointegration. In: **Tissue Integrated Prostheses**. Osseointegration in clinical dentistry, Chicago, Quintessence, p.1-6, 1985.

BRÄNEMARK, P. I., BJORN, L. R., SKALAK, R. *Osseointegration in skeletal reconstruction and joint replacement*. **Workshop on Osseointegration in Skeletal Reconstruction and Joint Replacement**, 2., 1997, Chicago. [Proceedings]. Chicago: Quintessence, 1997.

BRETT, C.M.A. & BRETT, A.M.O. Electrochemistry – Principles, methods and Applications. **Oxford University Press**, 1996.

CAMPOS W.G. Avaliação do Efeito do Complexo Osseína-Hidroxiapatita na Consolidação das Fraturas na Desnutrição Protéica: Estudo Experimental em Ratos. **Acta Ortop Bras**, 9(2), 03-7, 2001.

CARDOSO, S.P. *et al.* . Medidas De Potencial De Circuito Aberto: Um Experimento Para o Ensino De Eletroquímica. **Quim Nova**, 28 (5), 756-76, 2005.

CARVALHO, A.C.A.; PEREIRA E. C.S.C.; COSTA C.; BARRETO I.C.; MADUREIRA L.C.; PAIM F.R. Estratégias Regenerativas Da Bioengenharia Tecidual E Aspectos Éticos. Bioengineered Tissue Regenerative Strategies And Ethical Aspects. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 2010.

CHIANG C, CHIOU S, YANG W, HSU M, YUNG M, TSAI M., CHEN L. , HUANG H. Formation of tio2 nano-network on titanium surface increases the human cell growth. **Dental Materials**; 25; 1022–1029, 2009.

CLEMENT F.& CAPELLADES R. Anodic oxidation of titanium up to 100 V. **Electrochimica Acta**, 33, 433, 1983

CRAWFORD G.A.; CHAWLA N. DAS K. BOSE S. BADYOPADHYAY A. Microstructure and deformation behavior of biocompatible TiO₂ nanotubes on titanium substrate. **Acta Biomaterialia**,3, 359-367, 2007.

DATASUS. **Procedimentos Hospitalares do SUS por Local de Internação no Brasil**, 2007.

DYER, C.K. & LEACH J.S.L. Reversible Reactions Within Anodic Oxide Films on Titanium Eelectrodes. **Electrochimica Acta**, 23, p.1387, 1978.

ENGH C.A., CONNOR D., JUSTY M., *et al.* Quantification Micromotion, Stain Shielding and Bone Resorption with Porous – Coated Anatomic Medullary locking Femoral Protheses. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, April, 1992.

FERNANDES H.J.A, REIS F.B, NETO P.F.T, BELANGERO W.D. Placa em Ponte e Haste Intramedular Bloqueada: Estudo Comparativo No Tratamento De Fraturas Multifragmentárias da Diáfise Do Fêmur. **Rev. Bras de Ortop.** Vol 37, n 9, 2002.

FRANCO R.L.; CHIESA R.; OLIVEIRA P.T.; BELO M.M.; ROSA A.L. Bone Response to a Ca- and P-Enriched Titanium Surface Obtained By Anodization. **Braz Dent J.**, 19(1), p. 15-20, 2008.

FROSH K.H; SONDERGELD I.; DRESING K.; RUDY T. *et al.* Autologous Osteoblast Enhance Osseointegration Of Porous Titanium Implants. *Journal of orthopaedic research*, 21, p. 213-223, 2003.

GIORDANI E.J, GUIMARAES V.A. PINTO T.B., FERREIRA I. Propriedades De Corrosão De Dois Aços Inoxidáveis Austeníticos Utilizados Como Biomateriais. **Simpósio De Materiais** , 2003.

GIORDANI E.J.; FERREIRA I.; BALANCIN O. Propriedades mecânicas e de Corrosão de dois Aços inoxidáveis austeníticos utilizados na fabricação de implantes ortopédicos. *R. Esc. Minas.*, Ouro Preto, 60 (1), 55-62, 2007.

GIORDANO E.J.; FALLEIROS-ALONSO N.; FERREIRA I.; BALANCIN O. electrochemical behavior of two austenitic stainless steel biomaterials. **R. Esc. Minas**, Ouro Preto, 63 (1), 2010.

GUGELMIN B. S. Estudo da Estabilidade de Filmes de Óxido de Titânio e da Hidroxiapatita Por Meio de Técnicas Eletroquímicas. **Universidade Federal Do Paraná** [dissertação de mestrado], Curitiba, 2009.

GUASTALDI A.C. & APARECIDA A.H. Fosfatos De Cálcio De Interesse Biológico: Importância Como Biomateriais, Propriedades E Métodos De Obtenção De Recobrimentos. **Quim. Nova**, vol. 33, n. 6, 1352-1358, 2010.

GUASTALDI A.C & RAMIRES I. Estudo Do Biomaterial Ti-6Al-4V Empregando-se Técnicas Eletroquímicas e Xps. **Quim. Nova**, Vol. 25, n. 1, 10-14, 2002.

Handbook, Metals. Corrosion. **American Society for Metals**, 1997.

HANDBOOK OF MATERIALS FOR MEDICALS DEVICES. Edited by Jr Davis. **ASM International**, 2003.

HE G. & HAGIWARA M. Ti Alloy Design Strategy for Biomaterial Applications. **Materials Science and Engineering**, v. 26, p 14 – 19 , 2006.

HENCH L.L.; SPLINTER R.J.; ALLEN W.C.; GREENLEE T.K. Bonding Mechanisms at the Interface of Ceramics Prosthetic Materials. *J Biomed Mater Res*, 2, p 117–41, 1972

IBGE - **Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil**: 2009.

JAIMES R.F.V.V; AFONSO M.L.C.A; ROGERO S.O; BARBOSA C.A; SOKOLOWSKI A; SANTOS A . Produção de Filmes de Óxido de Titânio por Oxidação Anódica a Microarco. **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, [dissertação de mestrado], 2008.

JESUÍNO G.A.; RIBEIRO L.M.F.; NAKAZATO R.Z. CODARO E.N. HEIN L.R.O. Propriedades Mecânicas e Resistência à Corrosão da Liga Ti-4Al-4V Obtida da Reciclagem da Liga Ti-6Al-4V. **Materials Research**, v. 4, n. 2, 63-69, 2001.

KAY M.I. YOUNG, R.A.; POSNER A.S. Crystal structure of hidroxyapatite. **Nature**, 204, 1050, 1964.

KOKUBO T.; KUSHITANI H.; SAKKA S.; KITSUGI T.; YAMAMURO T. Solutions Able To Reproduce In Vivo Surface-Structure Change In Bioactive Glass-Ceramic A–W. **J Biomed Mater Res**, vol 24, p. 721–34. 1990.

KOKUBO, T. “Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment.” **Acta Mater**. 46 (7), 2519-2527, 1998.

KOKUBO T, KIM H-M, MYIAJI F, TAKADAMA H, MIYAZAKI T. Ceramic–Metal And Ceramic–Polymer Composites Prepared By A Biomimetic Process. **Composites Part A: Appl Sci Manufacturing**.,30 (4),405-9, 1999.

KOKUBO, T. & TAKADAMA, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? **Biomaterials**, 27 (15), 2907-2915, 2006.

KOKUBO T, MIYAJI F., KIM H. M. Spontaneous Formation of Bonelike Apatite Layer on Chemically Treated Titanium Metals. **J Am Ceram Soc.**,79,4, p.1127-9, 1996.

LAKSTEIN D.; KOPELOVITCH W.; BARKAY Z.; BAHAA M.; HENDEL D.; ELIAZ N. enhanced osseointegration of grit-blasted, NaOH-treated and electrochemically hydroxyapatite-coated Ti6Al4V implants in rabbits. *Acta Biomaterialia*, 5, 2258-69, 2009.

LE GUEHENNEC, L., *et al.* Osteoblastic Cell Behaviour On Different Titanium Implant Surfaces. **Acta Biomaterialia**, 4, 535–543, 2008.

LEE B.; LEE C.; KIM D.; CHOI K.; LEE K. H. KIM Y. Effect Of Surface Structure On Biomechanical Properties And Osseointegration. **Materials Science and Engineering C**; 28 1448–1461, 2008.

LIEBERMAN J. & FRIEDLAENDER G. E. Bone Regeneration And Repair. **Biology And Clinical Applications**. Human Press, 2005.

LIU X., CHU P. K., DING C. Surface Modification Of Titanium, Titanium Alloys and Related Materials for Biomedical Applications. **Materials Science and Engineering**, v. 47, p. 49-121, 2004.

MARINO, C.E.B. Estudos eletroquímicos sobre os materiais biocompatíveis Ti e Ti6Al4V. **Tese de doutorado** -UFSCar, 2001.

MARIOLANI J., BELANGERO W.D, ARRUDA A.C.F. Sugestão de Metodologia Para Avaliação da Interface Implante/Tecido Ósseo. **Rev Bras Ortop**, 6 (28), 371- 4, 1993.

MARQUES C. Tratamento de Superfícies de Implantes De Titânio. [**Dissertação de Mestrado**]. Rio de Janeiro, Instituto Militar de Engenharia, 2007.

MORAES F.B, SILVA L.L.S, FERREIRA F.V, FERRO A.M, ROCHA V.L, TEIXEIRA K.S. Avaliação Epidemiológica e Radiológica das Fraturas Diafisárias do Fêmur: Estudo De 200 Casos. **Rev Bras Ortop**. 44 (3),199-203, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.Washington, DC. **National Academy Press**, 1996.

OLIVEIRA N.T.C & GUASTALDI A.C. Estudos Eletroquímicos de Ligas Ti-Mo de Interesse para Biomateriais. **Corros. Prot. Mater.**, vol 26, n 2, 2007.

PARK J. KIM H.; KIM Y.; JANG J.; SONG H. HANAWA T. Osteoblast response and osseointegration of a Ti-6Al-4V alloy implant incorporating strontium. **Acta Biomaterialia.**, 6, 2843-2851, 2010.

POURBAIX A., MAREK M., HOCMAN R.F. Comportement Electrochimique du titane a bas pH et a bas potentiel d'electrode. **Cebelcor**. Rt.197. 1971.

POURBAIX, M; MUYLDER, J.V. & SCHMETS, J. **Pourbaix Diagrams**. Section 8.1, Nace Cebelcor, pp 213 -221, 1974.

PRADO F.A.; ANBINDER A.L.; JAIME A.P.G.; LIMA A.P.; BALDUCCI I.; ROCHA R.F. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. Ver. Odont da USP, 18, 1, 7-13, 2006.

PRETTO J.L.B. & PAGNONCELLI R.M. Avaliação por meio de mev da região periimplantar após irradiação com laser diodo, infravermelho ($\lambda = 830\text{nm}$), em

implantes de titânio situados em tíbia de rato. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2005.

PULEO D.A. & NANJI A. Understanding and Controlling the Bone Implant Interface. **Biomaterials** , 20, 2311-21, 1999.

QI G.; ZHANG S.; KHOR K.A.; WENG W.; ZENG X.; LIU C. An interfacial study of sol-gel-derived magnesium apatite coatings on Ti6Al4V substrates. **Thin Solid Films**. Vol 5, n 16, 5172–5175, 2008.

RATNER B.D. Biomaterials Science. **An Introduction to Materials in Medicine**; 2nd Edition, 2004.

ROSA F.P; JUNIOR E.M.; PIZZAIA M.A.; GABRIELLI M.A.C.; LIA R.C.C.; BOSCHI A.O; SANTOS L.A. Avaliação Histológica de Três Diferentes Tipos de Hidroxiapatita Implantadas em Arco Zigomático de Rato. São Paulo, **Rev Odontol.**, 27 (2), 495-508, 1998.

SANTOS A. Produção de Filmes de Óxido de Titânio Por Oxidação Anódica a Microarco. **Universidade Federal do Rio de Janeiro** [dissertação de mestrado], 2008.

SEDRIKS A J. Corrosion of Stainless Steels. Canada, 2ªed. John Wiley and Sons, 1996.

SINGER B.R, MCLUCHAN G.J, ROBINSON C.M, CHISTIE J. Epidemiology Of Fractures In 1500 Adults: The Influence of Age Gender. **J Bone Joint Surg Br**, 80, 240-8, 1998.

SHALABI, M.M., GORTEMACKER, A., VAN'T HOF, M.A., JANSEN, J.A., CREUGERS, N.H.J. Implant Surface Roughness and Bone Healing: a Systematic Review. **J Dent Res**, 85(6), 496-500, 2006.

SOUZA C.E.; MACHADO S.A.S.; MAZO L.H.; AVACA L.A. Oxidação Eletroquímica do Cromo (III) sobre Pb/PbO₂. **Química Nova**, São Paulo, v 16, 1993.

NOVAES A.B.; SOUZA S.L.S.; BARROS R.R.M.; PEREIRA K.K.Y.; IEZZI G.; PIATTELLI A. Influence of Implant Surfaces on Osseointegration. **Braz Dent J.**, 21(6), 471-48, 2010.

SEKERES T.S.; FALDINI S.B. estudo do comportamento em corrosão dos biomateriais titânio, liga Ti6Al4V e aço inox 316L para uso em implante ortopédico. **Universidade do Vale do Paraíba**, X Encontro Latino Americano, 2006.

SOKEI C.R.; FARIA E.B.; TOKIMATSU R.C.; FERREIRA I. Análise das partículas de segunda fase no aço inoxidável austenítico de alto nitrogênio ISO 5832-9. **Sem Brás do A.**, São Paulo, 2004.

SUDARSHAN T.S, SRIVATSAN T. S. HARVEY D.P. Fatigue Processes In Metals – Role Of Aqueous Environments. **Engineering Fracture Mechanics**, v. 36, n.6, p. 827-852, 1990.

SUL Y.; JOHANSSON C.B.; PETRONIS S.; KROSER A.; JEONG Y.; WENNERBERG A.; ALBREKTSSON T. Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidezed pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition. *Biomaterials*, 23, 491-50, 2002.

SUL Y. The significance of the surface properties of oxidized titanium to the bone response: special emphasis on potential biochemical bonding of oxidezed titanium implant. *Biomaterials*, 24, 3893-3907, 2003.

SUZUKI K.; AOKI K.; OHYA K. Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling activity of femur in rabbits. **Bone**, v 21, n6, 507-514, 1997.

TOSSATO L.T.D. Estudos do crescimento anódico de óxidos e da deposição de apatitas sobre a liga biocompatível Ti-13Nb-13Zr. **Tese de doutorado**. UFSCar, 2009.

TSCIPTSCHI A.P. & PINEDO C.E. Estrutura e propriedades do aço inoxidável austenítico AISI 316L Grau ASTM F138 nitretado sob plasma à baixa temperatura. **R. Esc. Minas**, Ouro Preto, 63(1), p.137-141, 2010.

UPMAN P.J. **ISO 10993-6: Tests for Local Effects After Implantation**. Bonezone. Spring, 2006.

VASUDEV D.V, RICCI J.L., SABATINO C., LI P., PARSONS JR. In Vivo Evaluation Of A Biomimetic Apatite Coating Grown On Titanium Surfaces. **J Biomed Mater Res.**,69, 629-36,2004.

VERCIK L.C.; ASSIS C.M.; FOOK M.V.L.; SANTOS M.L.; GUASTALDI A. C. Recobrimentos de Apatita *In Vitro* Sobre Titânio – Influência do Tratamento Térmico. **Eclética Química**, vol 28, n 1, 2003.

VIDIGAL JR G.M. Caracterização Dos Tecidos Ósseos Sadios E Osteoporóticos Aos Implantes De Titânio E Implantes Recobertos Com Hidroxiapatita [tese de doutorado]. Rio de Janeiro: **Universidade Federal do Rio de Janeiro**; 2002.

VIDIGAL JR. G.M. Histomorphometric analisys of hidroxyapatite- coated and uncoated titanium dental implants in rabbit cortical bone. **Implant Dentistry**, 8, 295, 1999.

VILLAMIL R.F.V.; AFONSO M.L.C.A.; ROGERO S.O.; BARBOSA C.A.; SOKOLOWSKI A.; AGOSTINHO S.M.L. Estudo eletroquímico comparativo do aço ISO 5832-9 em diferentes meios de interesse biológico. **R. esc. Minas**. 63,1, 2010.

VILLAMIL R.F.V.; ARANHA H.; AFONSO M.L.C.A; MERCADANTE M.T.; AGOSTINHO S.M.L. Aços inoxidáveis em implantes ortopédicos: fundamentos e resistência à corrosão. **Rev. Bras. Ortop.** V 37, n 11/12, 2002.

XIN F.; JIAN C.; ZOU J.; ET AL. Bone –like formation on HA/316L stainless steel composite surface in simulated body fluid. **Trans. Nonferrous Met. Soc.**, China, 19, 347-352, 2009.

XUHUI Z.; YANG L.; ZUO Y.; XIONG J. Hydroxyapatite Coatings on Titanium Prepared by Electrodeposition in a Modified Simulated Body Fluid. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 17(4) 667-671, 2009.

www. <http://marcelacortes.vilabol.uol.com.br/imagens/tecido> acesso março de 2012

YANG, W.; HSIUNG H. Improving The Biocompatibility Of Titanium Surface Through Formation Of A TiO₂ Nano-Mesh Layer. **Thin Solid Films**, 518, 7545–7550, 2010.

YOKOYAMA K, *et al.* Fracture Mechanics Of Retrieved Titanium Screw Thread In Dental Implants. **Biomaterials**, 2002.

YU W., JIANG X.Q. *et al.* The effect of anatase TiO₂ nanotube Layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation and differentiation. **Journal of Biomedical Materials Research** part a, 2010.

YUN K.; YANG Y.; LIM H.; OH G.; HOH J. BAE I.; KIM J.; LEE K.; PARK S. Effect of Nanotubular-micro-roughed titanium Surface on cell response in vitro and osseointegration in vivo. **Materials Science and Engineering C.**, 30, p. 27-33, 2010.

ZANIN M.S; RIGO E.C.S; BOSCHI A.O. Recobrimento Biomimético De Hidroxiapatita Com Pré-Tratamento Alcalino-Térmico sobre Aços Inoxidáveis Austeníticos. **Rev Bras de Engenharia Biomédica**, 2007.

ZHAO G.; SCHWARTZ Z.; WIELAND M.; RUPP F.; GEIS-GERSTORFER J.; COCHRAN D.L. High Surface Energy Enhances Cell Response To Titanium Substrate Microstructure. **J Biomed Mater Res A**, vol. 74, p.49-58. 2005.

ZHU, X., *et al.* Anodic oxide films containing Ca and P of titanium biomaterial. **Biomaterials**, **22**, 2199-2206, 2002.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 526 B

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.064597/2011-11

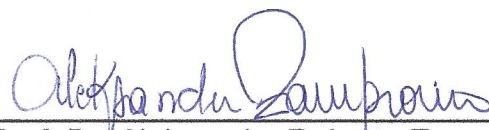
APROVADO: 05/04/2011-RO 03/2011

Modificação aprovada em: 06/06/2012-R.O. 05/2012

TÍTULO: Avaliação da interface osso/implante em superfícies de Ti6Al4V e do aço ISSC 58329 tratadas eletroquimicamente

AUTORES: Anna Raquel Silveira Gomes, Tatiana Cidral da Costa, Julye Leiko Yamazaki Ana Carolina Brandt de Macedo, Claudia Marino

DEPARTAMENTO: Setor Litoral UFPR


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Coordenador da CEUA

Certificado de Qualidade Nº.: 13026/10**Cliente :** CLIENTE PADRÃO**Pedido Cliente :** Tatiana**Referências Internas:** SANDINOX**Nota Fiscal Nº.:****Certificado de Origem Nº.:** 4225804 -

Liga / Material: Aço inoxidável	Especificações: ASTM F138	Tratamento Térmico:	
Acabamento: Laminado a frio	Produto (Estado Físico): Barra Chata	Dimensões (mm): 6.00 x 16.20	Tolerância: Esp. +0.05 / Larg. +-
Comprimento (mm): 300	Peso: 0.20 KG	Quantidade: 01 Amostra	

Composição Química (%)**Corrida :** 5409662

C	SI	MN	P	S	CR	MO	NI	CU
0.013	0.22	1.65	0.025	<0.001	17.50	2.75	14.35	0.10
B	N							
<0.0005	0.087							

Propriedades Mecânicas**Alongamento:** 15 %**Escoamento:** 760 MPa**Resistência a Tração:** 981 MPa**Dureza:** 31.0 HRC**Microinclusão :** Conforme norma ASTM E45

A.Fina:	0.0	B.Fina:	0.0	C.Fina:	0.0	D.Fina:	1.0
A.Grossa:	0.0	B.Grossa:	0.0	C.Grossa:	0.0	D.Grossa:	0.0

Microestrutura

Material Isento de ferrita

Obs :

Alguns dados foram extraídos do certificado de origem do fabricante da matéria prima.



Standard Specification for Wrought Titanium 6A1-4V ELI Alloy for Surgical Implant Applications¹

This standard is issued under the fixed designation F 136; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon (ϵ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

1. Scope

1.1 This specification covers the chemical, mechanical, and metallurgical requirements for wrought annealed Ti-6Al-4V E.L.I. (extra low interstitial) titanium alloy to be used in the manufacture of surgical implants.

1.2 The material in this specification has been subjected to testing in laboratory animals.^{2,3} The results of these studies and the clinical history indicate a well characterized level of local biological response.^{4,5}

1.3 The values stated in inch-pound units are to be regarded as the standard. The metric equivalents in parentheses are provided for information only.

2. Referenced Documents

2.1 ASTM Standards:

- B 265 Specification for Titanium and Titanium Alloy Strip, Sheet, and Plate⁴
- B 348 Specification for Titanium and Titanium Alloy Bars and Billets⁴
- B 381 Specification for Titanium and Titanium Alloy Forgings⁴
- E 8 Test Methods of Tension Testing of Metallic Materials⁵
- E 120 Test Methods for Chemical Analysis of Titanium and Titanium Alloys⁶
- E 290 Test Method for Semi-Guided Bend Test for Ductility of Metallic Materials⁷
- F 620 Specification for Titanium 6Al-4V ELI Alloy Forgings for Surgical Implants⁸
- 2.2 C1-1968 Specifications of General Requirements for a Quality Control Program⁹

3. Product Classification

3.1 *Strip*—Any product under 0.1875 in. (4.75 mm) in thickness and under 24 in. (610 mm) wide.

3.2 *Sheet*—Any product under 0.1875 in. (4.75 mm) in thickness and 24 in. (610 mm) or more in width.

3.3 *Plate*—Any product 0.1875 in. (4.75 mm) thick and over and 10 in. (254 mm) wide and over, with widths greater than five times thickness. Plate up to 1.75 in. (44.45 mm), thick inclusive is covered by this specification.

3.4 *Bar*—Rounds from $\frac{3}{16}$ in. (7.9 mm) to 1.75 in. (44.45 mm) in diameter. (Other sizes by special order.)

3.5 *Forging bar*—Bar as described in 3.4, used for production of forgings, may be furnished in the hot rolled condition.

3.6 *Wire*—Rounds less than $\frac{3}{16}$ in. (4.8 mm) in diameter.

4. Ordering Information

4.1 Inquiries and orders for material under this specification shall include the following information:

- 4.1.1 Quantity (weight or number of pieces),
- 4.1.2 Applicable ASTM designation,
- 4.1.3 Form (sheet, strip, plate, wire, bar, or forging),
- 4.1.4 Condition (See 5.1),
- 4.1.5 Mechanical properties (if applicable, for special conditions),
- 4.1.6 Finish (see 5.2),
- 4.1.7 Applicable dimensions including size, thickness, width, or print number,
- 4.1.8 Special tests, and
- 4.1.9 Special requirements.

5. Materials and Manufacture

5.1 The various titanium mill products covered in this specification are normally formed with the conventional forging and rolling equipment found in primary ferrous and nonferrous plants. The ingot metal for such mill operations is usually melted in arc furnaces of a type conventionally used for reactive metals.

5.2 *Finish*—Annealed material may be furnished to the implant manufacturer as descaled or pickled, sandblasted, ground, or combinations of these operations.

6. Chemical Requirements

6.1 The heat analysis shall conform to the chemical composition of Table 1. Ingot analysis may be used for reporting all chemical requirements, except hydrogen. Samples for hydrogen shall be taken from the finished mill product.

6.2 The product analysis tolerances shall conform to the check tolerances of Table 2.

6.3 For referee purposes, Methods E 120 shall be used.

6.4 Samples for chemical analysis shall be representative of the material being tested. The utmost care must be used in

¹ This specification is under the jurisdiction of ASTM Committee F-4 on Medical and Surgical Materials and Devices and is the direct responsibility of Subcommittee F04.02 on Resources.

Current edition approved June 29, 1984. Published September 1984.

² Laing, P. G., Ferguson, Jr., A. B., and Hodge, E. S., "Tissue Reaction in Rabbit Muscle Exposed to Metallic Implants," J. Biomed. Materials Research, Vol. 1, 1967, pp. 135-149.

³ Laing, P. G., "Compatibility of Biomaterials," Orthopedic Clinics of North America, Vol. 4, No. 2, April, 1973, pp. 249-273.

⁴ Annual Book of ASTM Standards, Vol 02.04.

⁵ Annual Book of ASTM Standards, Vol 03.01.

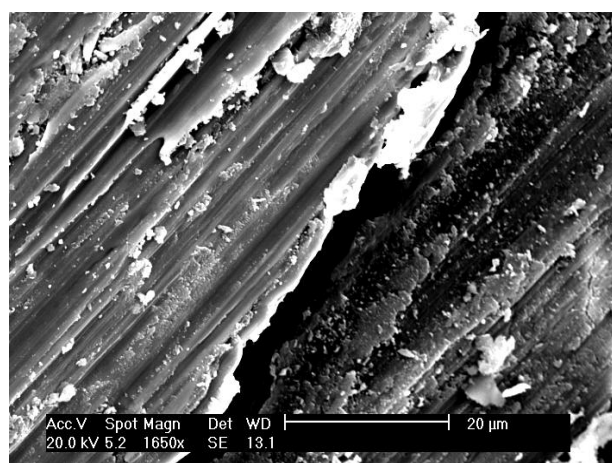
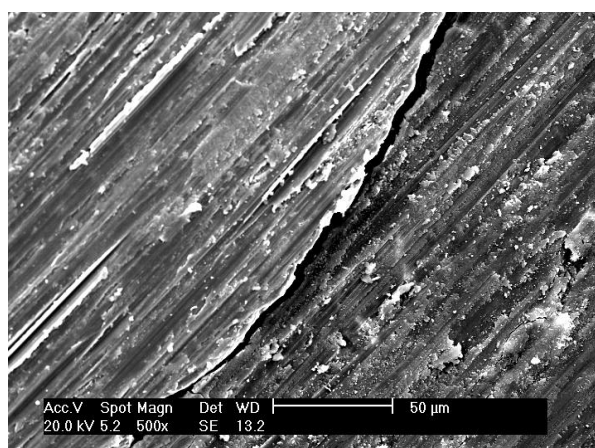
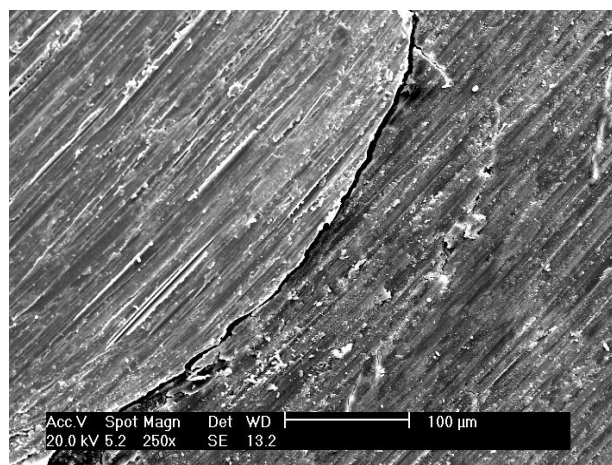
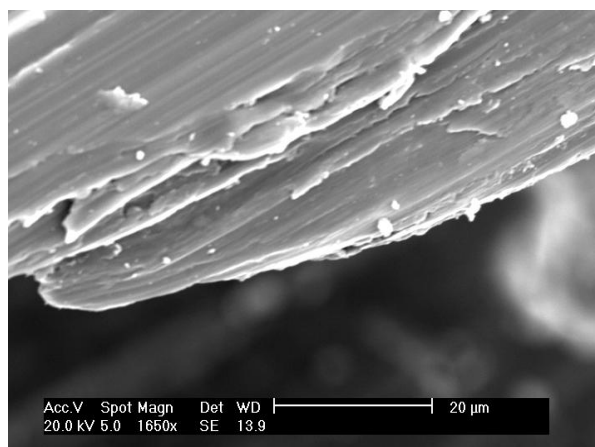
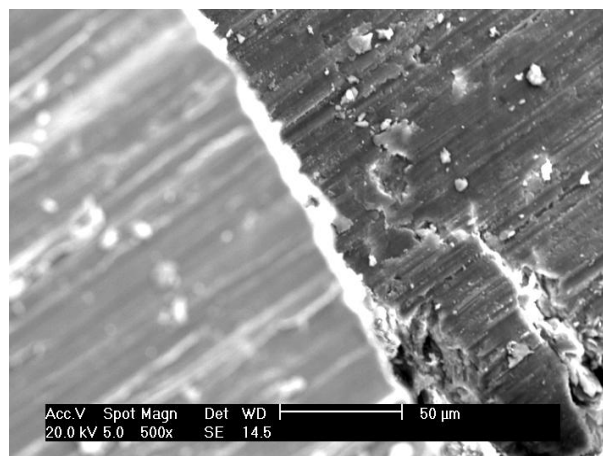
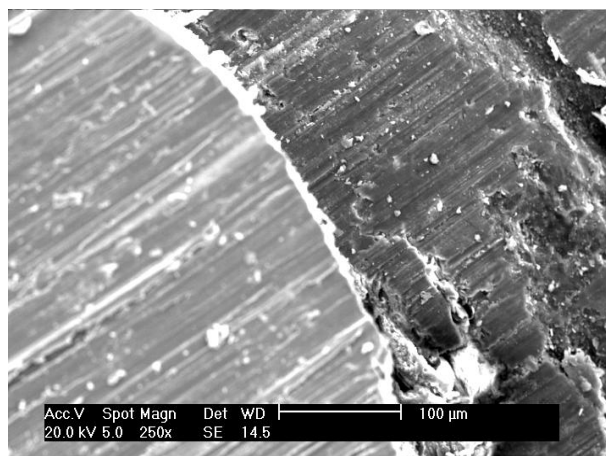
⁶ Annual Book of ASTM Standards, Vol 03.05.

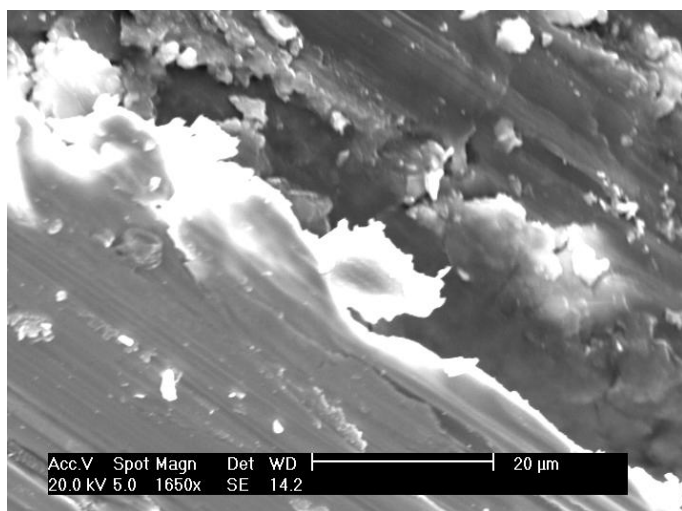
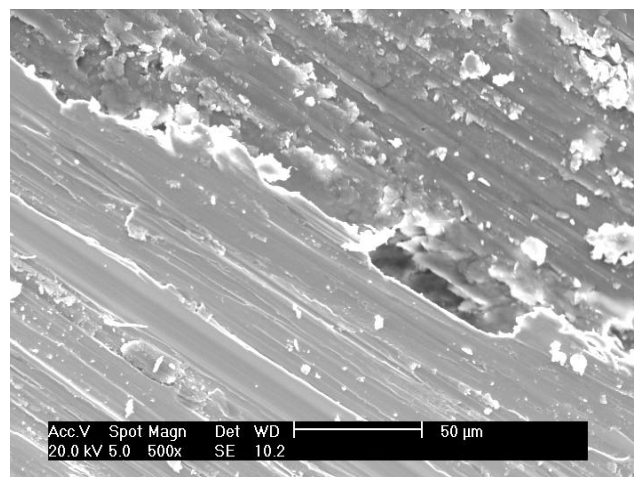
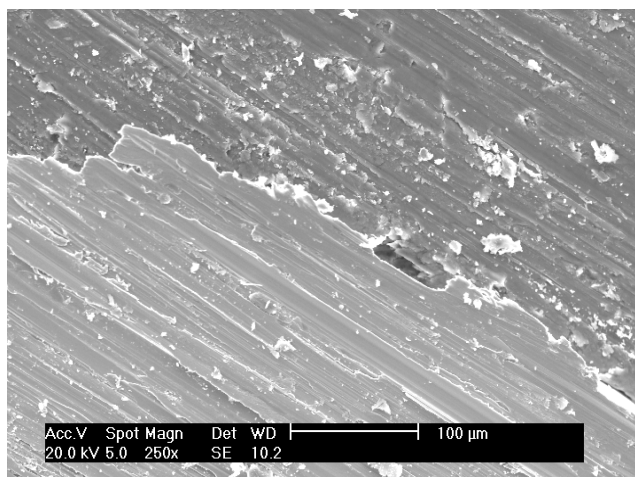
⁷ Annual Book of ASTM Standards, Vol 03.01.

⁸ Annual Book of ASTM Standards, Vol 13.01.

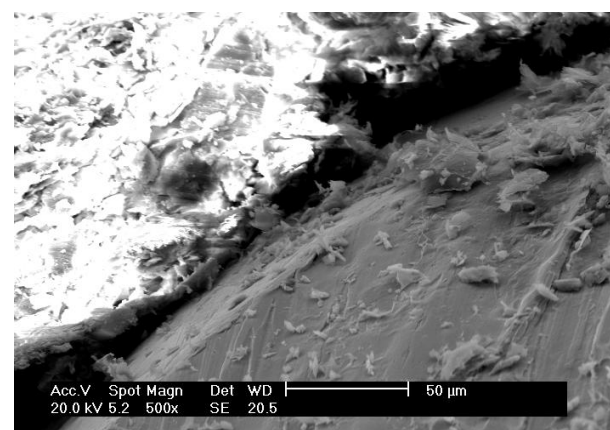
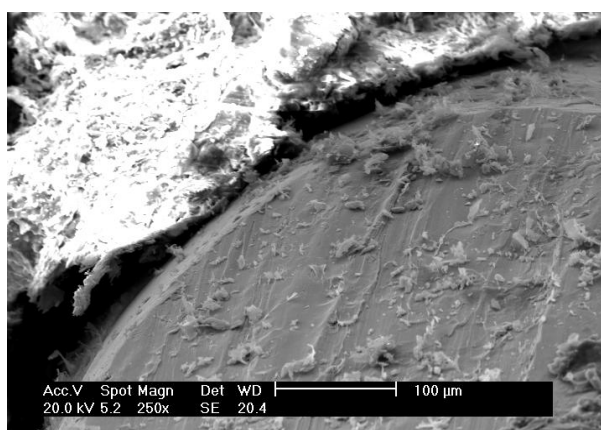
⁹ Available from American Society for Quality Control, 161 W. Wisconsin Ave., Milwaukee, WI 53203.

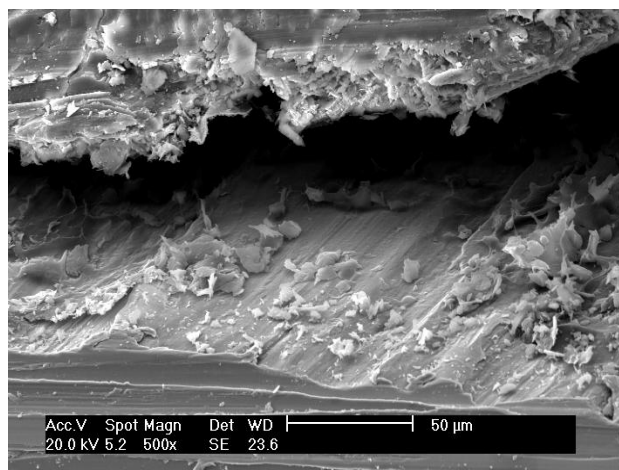
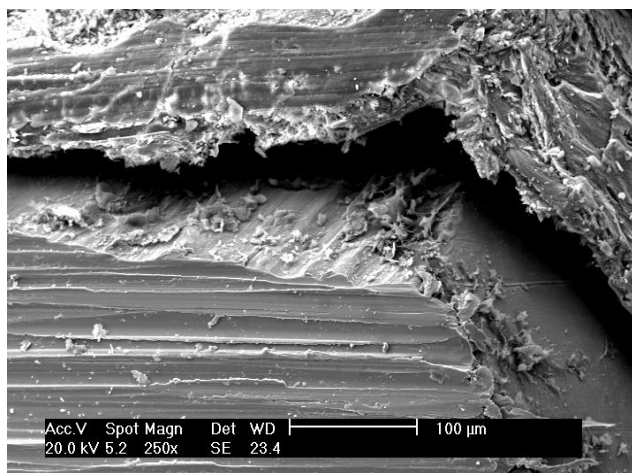
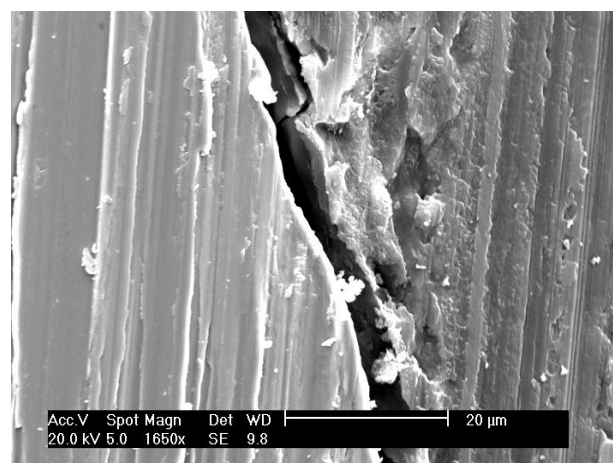
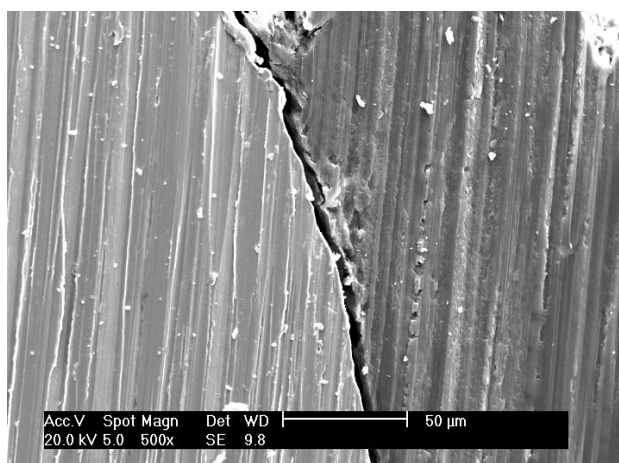
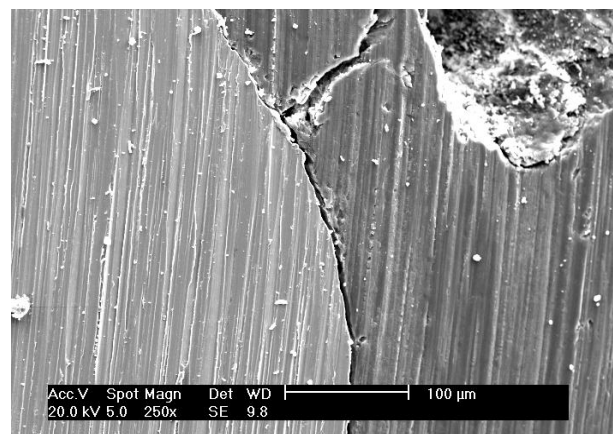
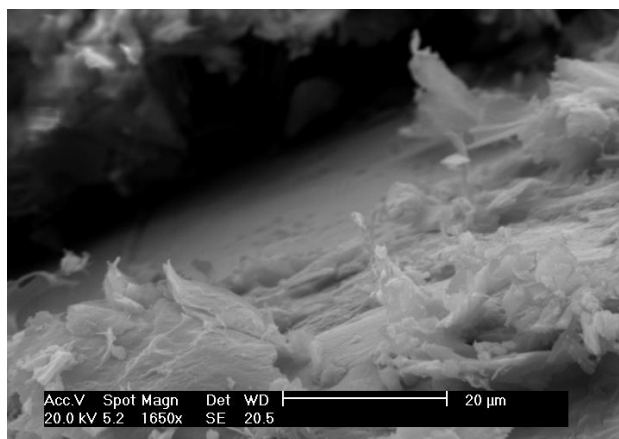
APÊNDICE

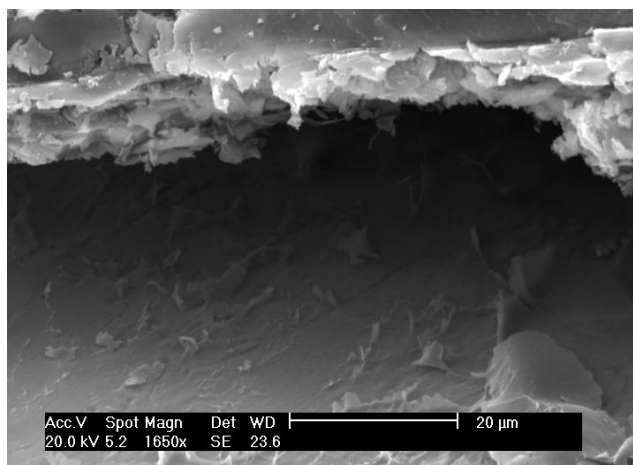
FOTOMICROGRAFIAS DO GRUPO CONTROLE TITÂNIO



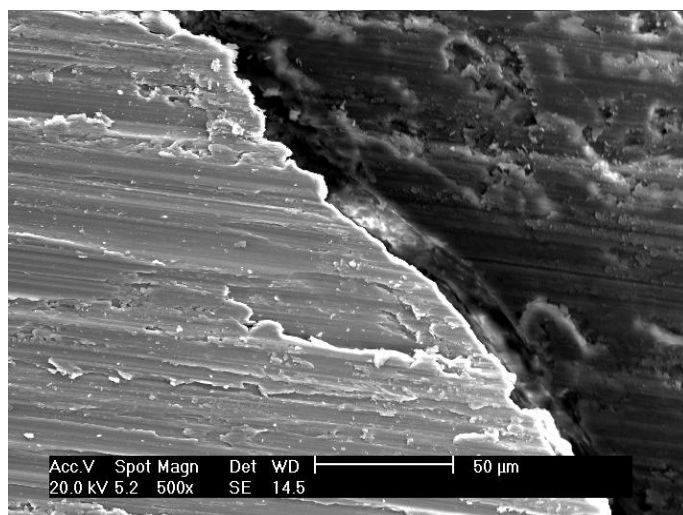
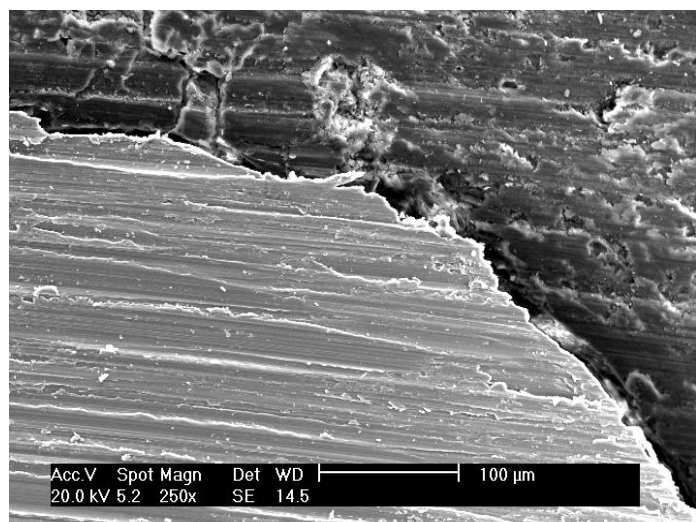
FOTOMICROGRAFIAS DO GRUPO CONTROLE ISO 5832-9

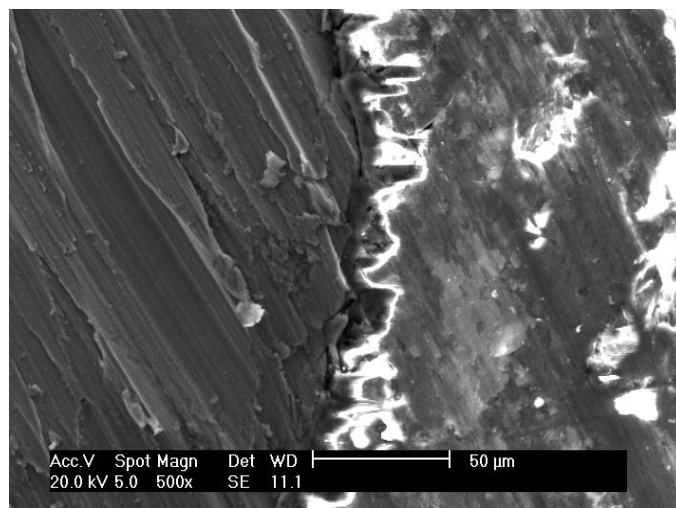
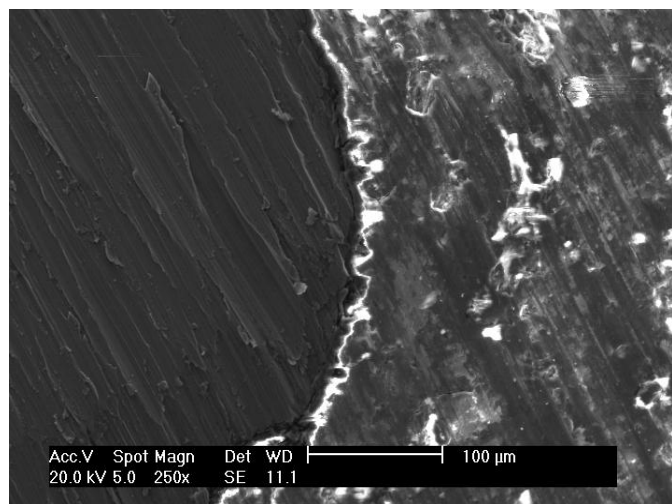
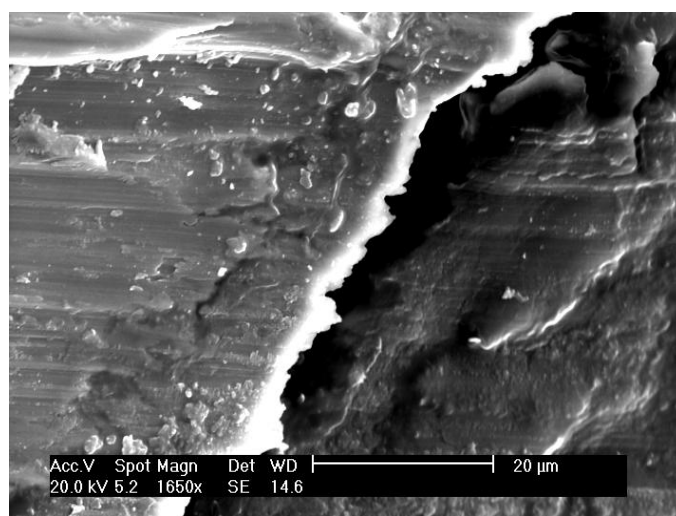
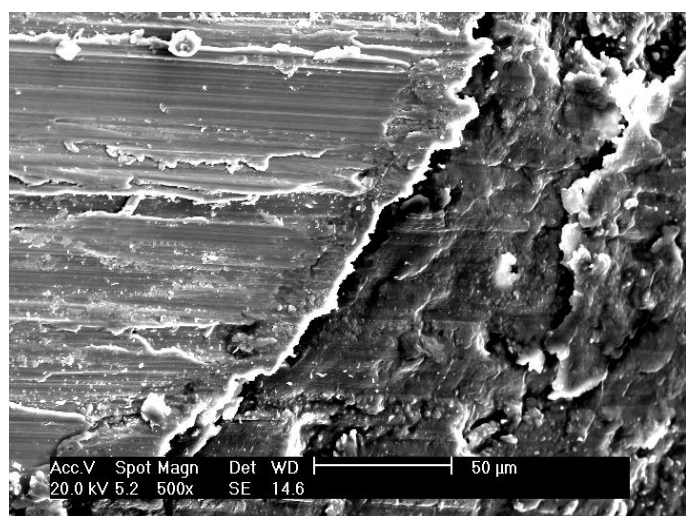
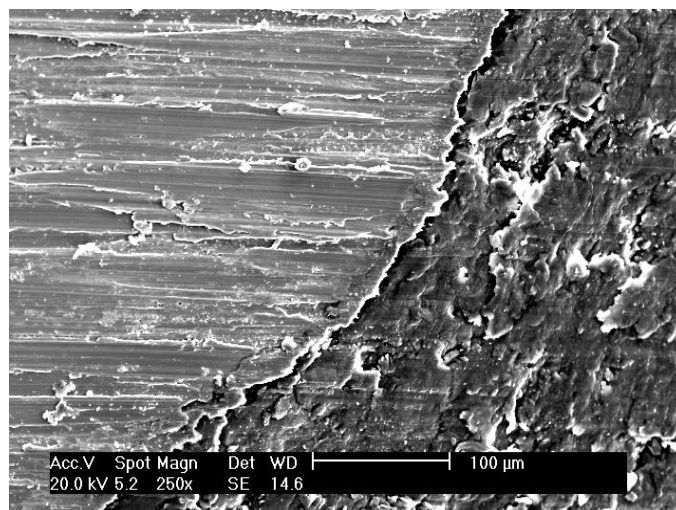
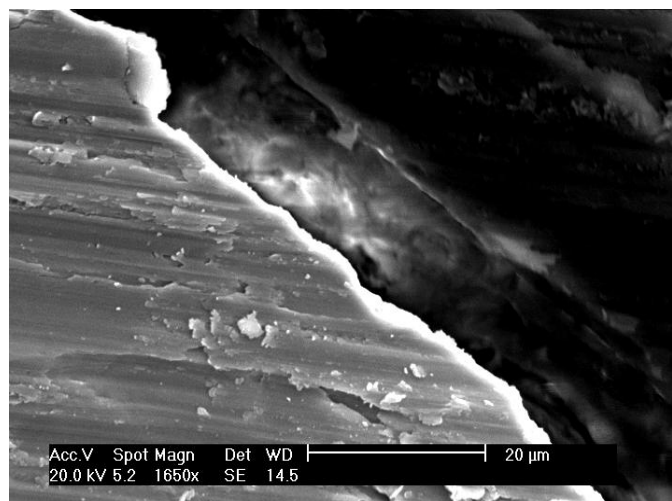


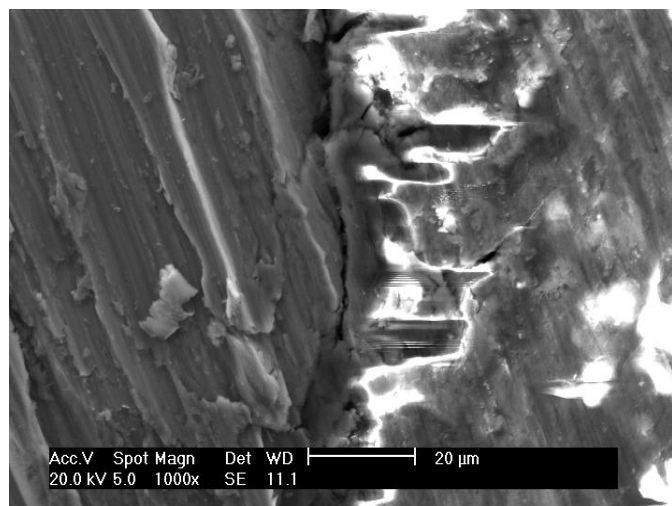




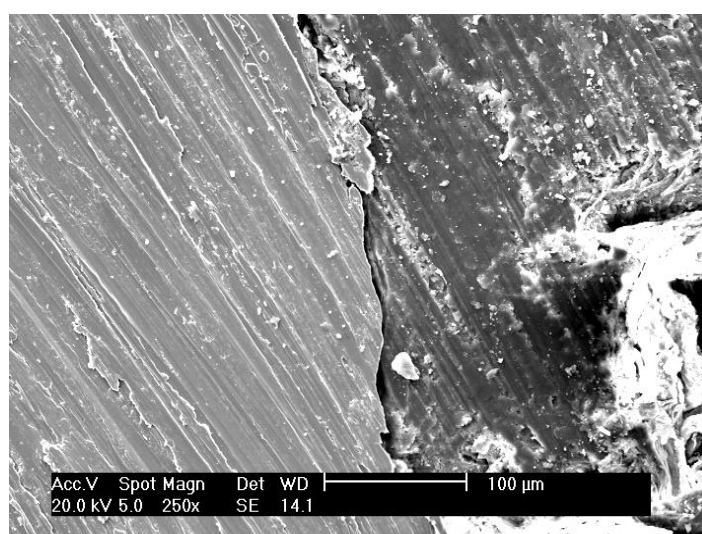
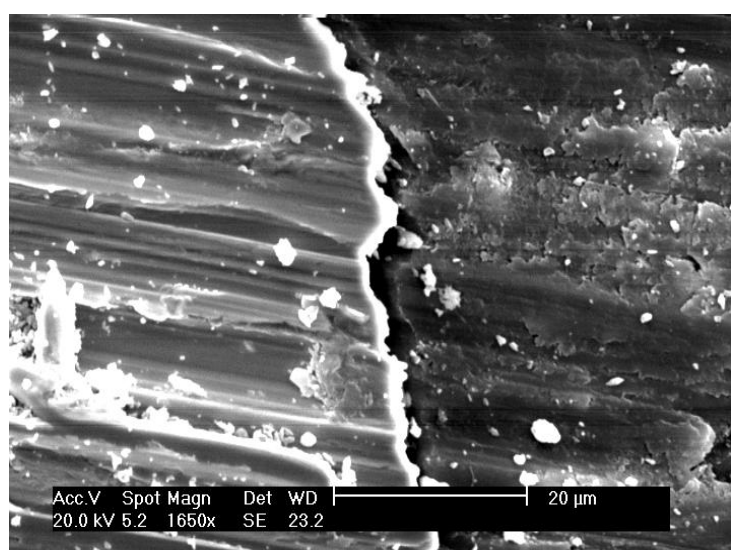
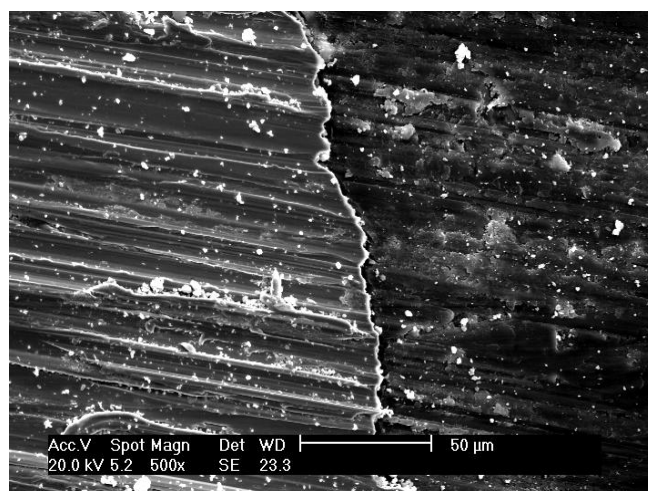
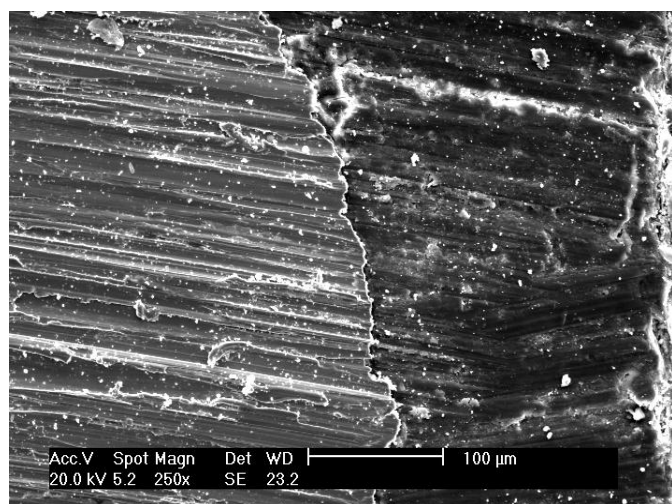
FOTOMICROGRAFIAS DO GRUPO ANODIZAÇÃO TITÂNIO

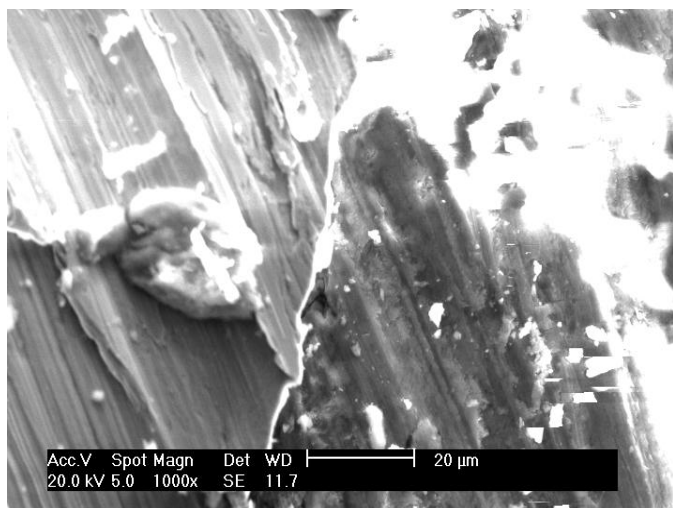
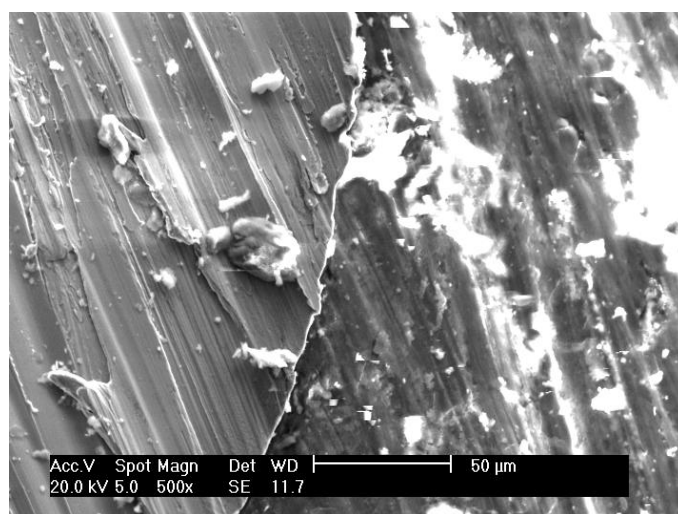
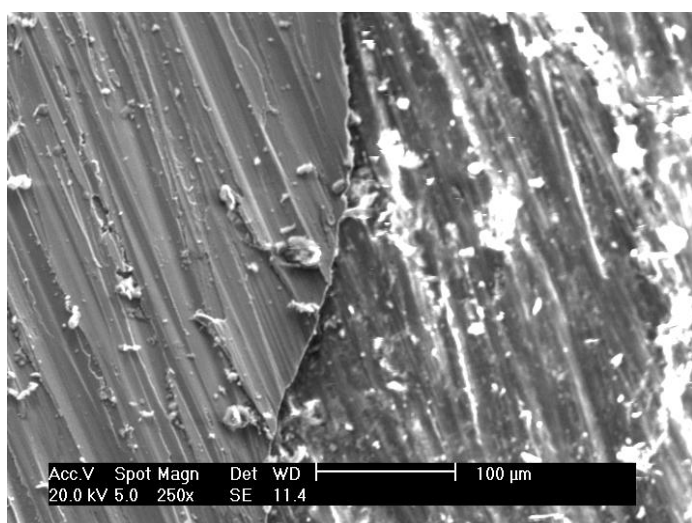
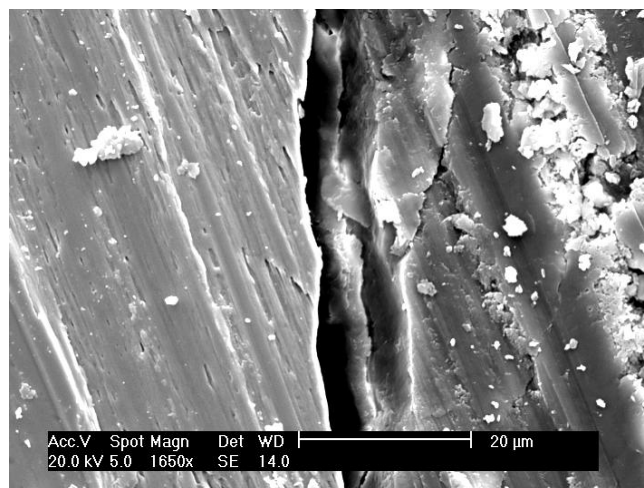
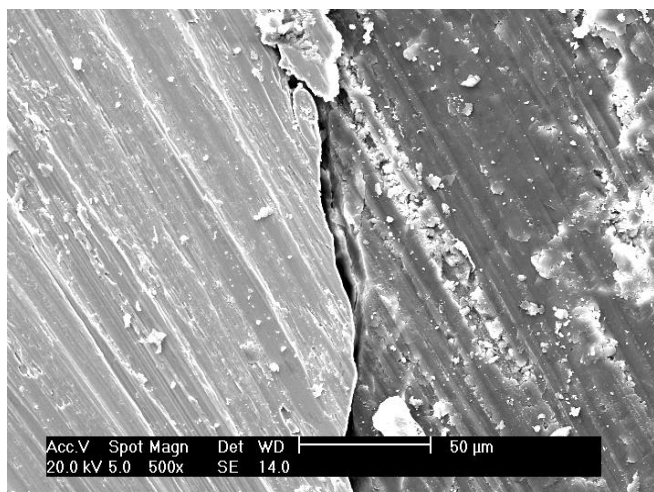




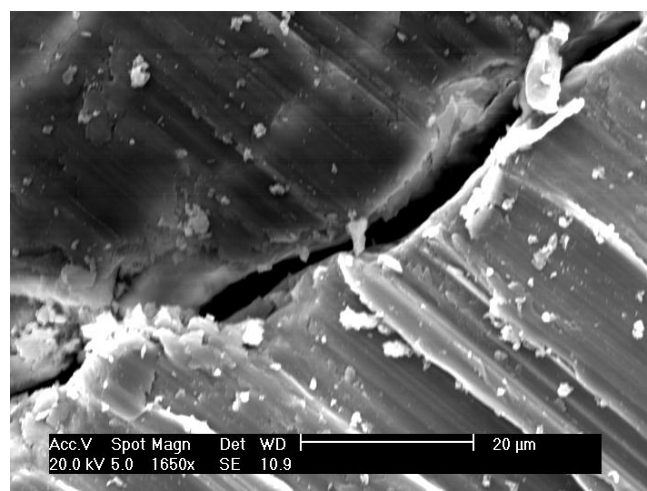
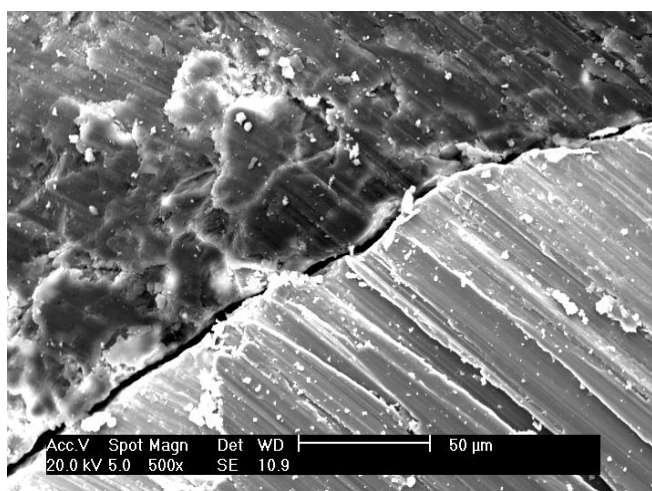
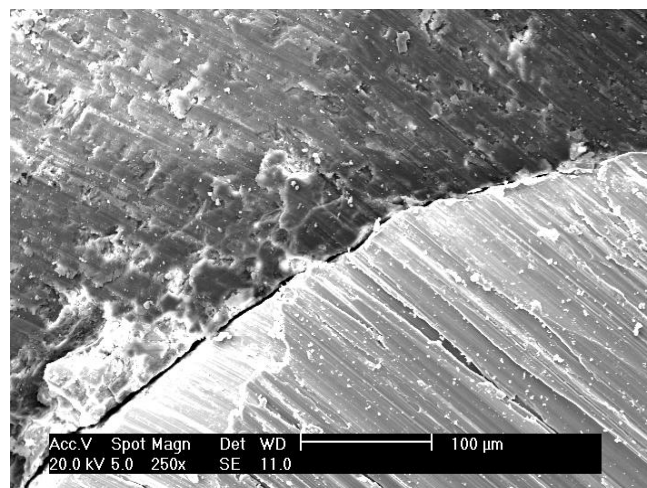
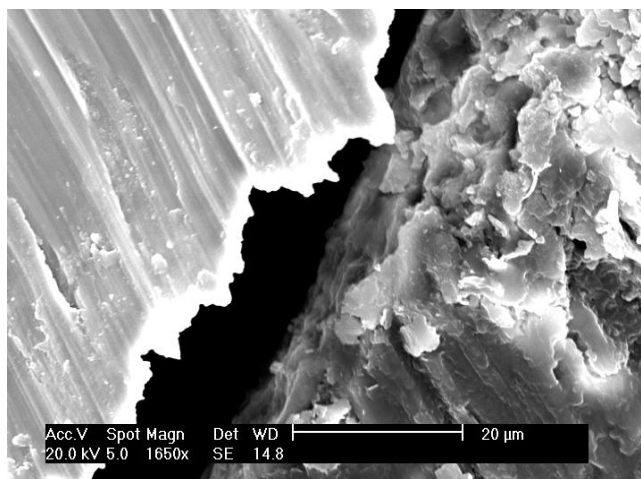
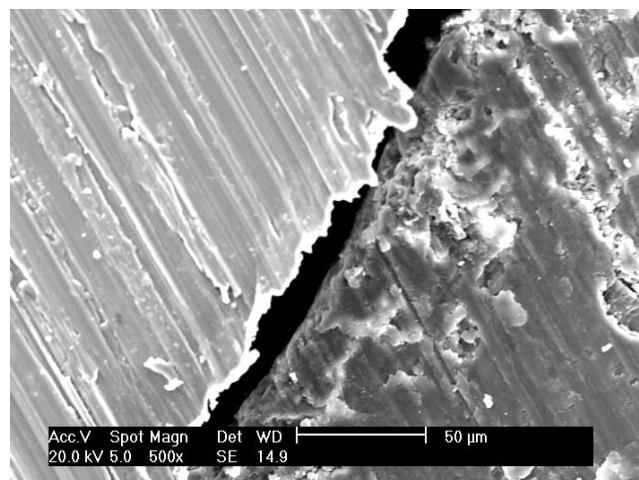
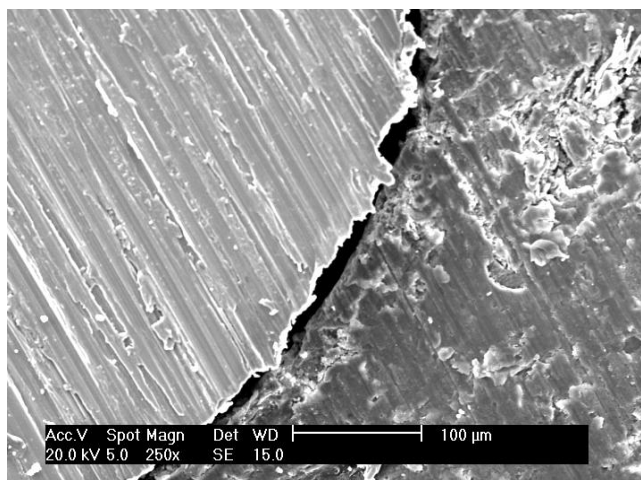


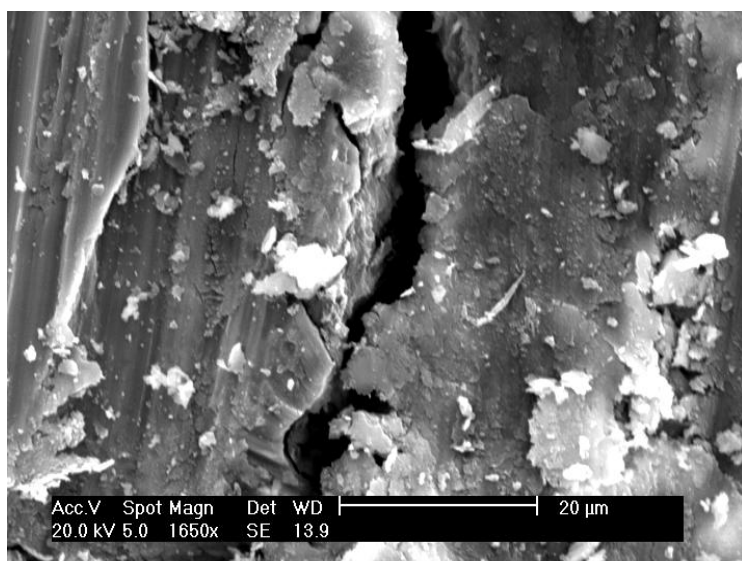
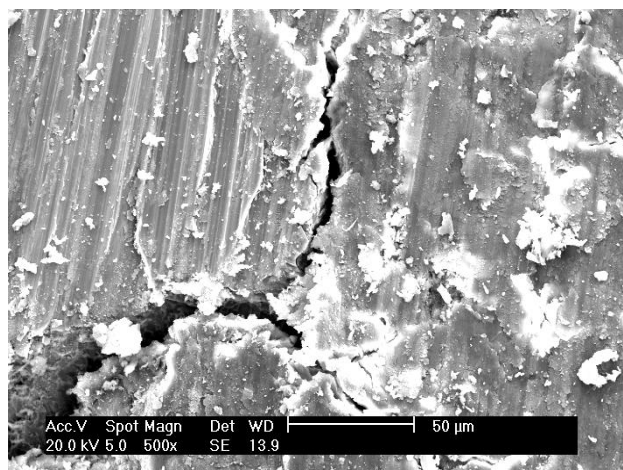
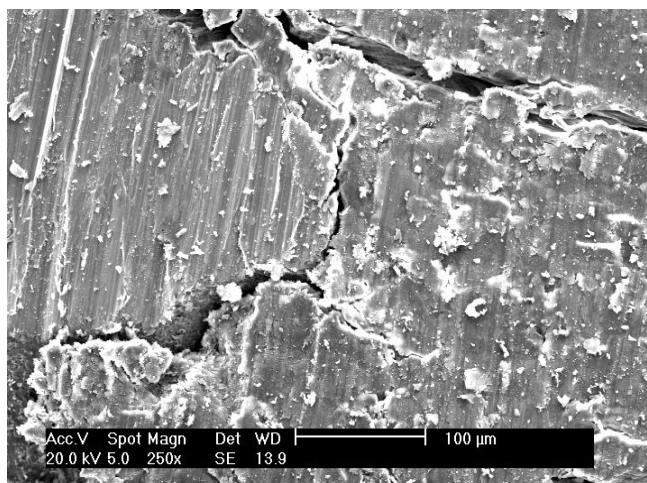
FOTOMICROGRAFIAS DO GRUPO ANODIZAÇÃO ISO 5832-9





FOTOMICROGRAFIAS O GRUPO TITÂNIO ANODIZAÇÃO / HIDROXIAPATITA





FOTOMICROGRAFIAS DO GRUPO ISO 5832-9 ANODIZAÇÃO/ HIDROXIAPATITA

